กรมวิชาการเกษตร
Department of Agriculture
แหล่งความรู้ แหล่งพัฒนา แหล่งก้าวหน้า

รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี ๒๕๔๖
เล่มที่ ๒

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คำนำ

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เป็นหน่วยงานใหม่ตามการปรับโครงสร้างแบ่งส่วนราชการในปี พ.ศ. 2546 โดยได้รวมหน่วยงานที่มีภารกิจหลักรับผิดชอบด้านงานวิจัยพัฒนาเกี่ยวกับงานอารักขาพืช สำหรับการวิจัยและพัฒนาจะเกิดเป็นผลข้อมูลหรือเทคโนโลยีในระดับงานวิจัยพื้นฐานประยุกต์และพัฒนา ของแต่ละปีงบประมาณนั้น จะต้องมีการจัดทำเอกสารรายงานผลการดำเนินงานในรูปแบบผลงานฉบับเต็ม

เอกสารวิชาการฉบับนี้ ได้จัดรวบรวมผลงานฉบับเต็มตามกลุ่มการดำเนินงานที่สอดคล้องกับยุทธศาสตร์งานวิจัยของกรมวิชาการเกษตรในปีงบประมาณ 2546 โดยมุ่งเน้น กลุ่มพืช/สาขาวิชา ชุดโครงการวิจัย โครงการวิจัยและกิจกรรม(ทะเบียนวิจัย) ที่ผ่านการพิจารณาของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ในส่วนของสำนักฯ ประกอบด้วย 8 กลุ่มพืช/ 4 สาขาวิชา 50 ชุดโครงการวิจัย 66 โครงการวิจัย จำนวน 122 กิจกรรม ซึ่งเป็นผลงานที่มีความหลากหลายด้านอารักขาพืช จากกลุ่มกีฏและ-สัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช และกลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชขอขอบคุณ นักวิชาการจากกลุ่มวิชาการ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ช่วยรวบรวมผลงานที่เกิดจากความตั้งใจ มุ่งมั่นทั้งสติปัญญา กำลังกาย กำลังใจ ในการผลิตผลงานดังกล่าวจัดทำเป็นเอกสารวิชาการ เพื่อให้เกิดประโยชน์สามารถนำไปใช้หรือเป็นแนวปรับปฏิบัติตามความเหมาะสมสำหรับนักวิชาการ นักส่งเสริม เกษตรกร และผู้ที่สนใจตามภารกิจที่เกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตาม สำนักฯ จะเป็นศูนย์กลางด้านอารักขาพืช เพื่อที่จะช่วยให้เกษตรกร หรือผู้ประกอบการได้มีทางเลือกที่เหมาะสม อันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญให้สอดคล้องกับสถานการณ์ และมาตรฐานการผลิตผลิตผลทางการเกษตรและอาหารที่ปลอดภัยเพื่อการบริโภคและการส่งออก ต่อไป

(นายสุภชัย แก้วมีชัย)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
พฤษภาคม 2548

สารบัญ

หน้า

ข้าวและธัญพืชเมืองหนาว

ข้าว : การวิจัยและพัฒนาการจัดการแมลงและสัตว์ศัตรูข้าว

- โครงการวิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนห่อใบข้าว แมลงหล่า แมลงบั่ว และหอยเชอรี่ ในภาคกลางและภาคใต้

• ผลกระทบของสารฆ่าแมลงต่อศัตรูธรรมชาติและโครงสร้าง.....1
ระบบนิเวศวิทยาของอาร์โทรปอดในนาข้าว
โดย นายสุวัฒน์ รวยอารีย์

: วิจัยและพัฒนาการจัดการวัชพืชในนาข้าว

- การวิจัยการใช้สารกำจัดวัชพืชอย่างถูกต้องและปลอดภัย

• เปรียบเทียบการแข่งขันของข้าวหอมสี่พันธุ์ในสภาพที่มีการกำจัด.....21
และไม่กำจัดวัชพืชในนาหว่านน้ำตม
โดย นางสาวเพ็ญศรี นันทสมสราญ และคณะ

- ศึกษาธรรมชาติวิทยาและการควบคุมหญ้าไม้กวาดในนาข้าว

• ความอยู่รอด และการเจริญเติบโตของหญ้าไม้กวาดภายใต้.....36
สภาพนิเวศต่างๆ
โดย นายไชยยศ สุพัฒนกุล

ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และพืชเส้นใย

ฝ้าย : วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตฝ้าย

- การจัดการศัตรูฝ้าย

• การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาว.....43
และผลกระทบของสารฆ่าแมลงประเภทไพรีทรอยด์สังเคราะห์
กับการระบาดเพิ่มของแมลงหวี่ขาวในฝ้าย
โดย นายสุเทพ สหายา และคณะ

• การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้าย.....72
โดย นายสุพจน์ กิตติบุญญา และคณะ

ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

- วิจัยและพัฒนาการบริหารศัตรูข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

•ปฏิกิริยาของข้าวโพดบางสายพันธุ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคราสนิม.....93
โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

: วิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาโรคราน้ำค้างในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

- วิจัยโรคราน้ำค้างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

•ปฏิกิริยาของข้าวโพดบางสายพันธุ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้าง.....104
โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

- วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพข้าวโพดฝักอ่อน

•เปรียบเทียบวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูข้าวโพดฝักอ่อนใน.....114
แปลงที่ใส่ปุ๋ยอินทรีย์และอนินทรีย์
โดย นางรจนา ไวยเจริญ และคณะ

- วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพข้าวโพดคั่ว

•เปรียบเทียบการเข้าทำลายของแมลงศัตรูและความสูญเสียใน.....129
ข้าวโพดคั่วพันธุ์ต่างๆ
โดย นางรจนา ไวยเจริญ และคณะ

พืชไร่ตระกูลถั่วและพืชไร่น้ำมัน

ถั่วเหลือง : เทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลืองให้เหมาะสมในแต่ละแหล่งปลูกและฤดูปลูก

- วิจัยเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูถั่วเหลือง

•อิทธิพลของความชื้นดินต่อการเกิดโรคเน่าดำของถั่วเหลือง.....147
โดย นายวุฒิศักดิ์ บุตรธนู และคณะ

•ปฏิกิริยาของถั่วเหลืองบางสายพันธุ์ต่อโรคแอนแทรคโนส.....156
โดย นางนลินี ศิวากรณ์ และคณะ

•การคัดเลือกสายพันธุ์ถั่วเหลืองให้ต้านทานโรคใบด่างในสภาพ.....165
เรือนทดลอง
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ

ถั่วลิสง : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตถั่วลิสง

- วิจัยและพัฒนาทดสอบเทคโนโลยีการผลิตถั่วลิสงให้เหมาะสมในแต่ละ
แหล่งปลูกและฤดูปลูก

- ศึกษาความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงเนื่องจากแมลงศัตรูใต้ดิน.....174
  โดย นางสาวเตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์ และคณะ
- การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูใต้ดินทำลายผลผลิตถั่วลิสงฝักต้ม.....188
  โดย นางสาวเตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์ และคณะ

ถั่วเขียว : วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและคุณภาพถั่วเขียว

- วิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาศัตรูถั่วเขียว

- ปฏิกิริยาพันธุ์ถั่วเขียวและการประเมินความต้านทานของ.....211
  ถั่วเขียวต่อเชื้อรา *Macrophomina phaseolina* สาเหตุ
  โรคเน่า
  โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- ปฏิกิริยาของถั่วเขียวสายพันธุ์ต่างๆ ต่อเชื้อรา *Oidium* sp.……..……218
  สาเหตุโรคราแป้งถั่วเขียว
  โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ

อ้อย : การบริหารศัตรูอ้อย

- การใช้หลักการบริหารศัตรูพืชสำหรับหนูในไร่อ้อย

- การสำรวจชนิดประชากรหนูและความเสียหายของอ้อย.....226
  โดย นางกรแก้ว เสือสะอาด และคณะ
- การเคลื่อนย้ายของหนูในไร่อ้อย.....248
  โดย นางกรแก้ว เสือสะอาด และคณะ
- ทดสอบสารกำจัดหนูสำหรับหนูศัตรูอ้อยในห้องปฏิบัติการ.....260
  โดย นางกรแก้ว เสือสะอาด และคณะ

ไม้ผล

มังคุด : วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มปริมาณและปรับปรุงคุณภาพมังคุด

- วิจัยและพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูมังคุดที่สำคัญ

- การวิจัยปัญหาแมลงวันผลไม้ในมังคุด.....274
  โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ
- การป้องกันกำจัดผีเสื้อมวนหวานในมังคุด.....293
  โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

: การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตมังคุดคุณภาพ

- การวิจัยการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสานเพื่อเสริมประสิทธิภาพการผลิตมังคุดคุณภาพ

•การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมังคุดโดยวิธีผสมผสาน.....300

โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

ทุเรียน : วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มปริมาณและปรับปรุงคุณภาพทุเรียน

- วิจัยและพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูทุเรียนที่สำคัญ

•การศึกษาเพลี้ยไฟศัตรูทุเรียนและการป้องกันกำจัด.....312

โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

: วิจัยและพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตทุเรียนคุณภาพ

- การป้องกันกำจัดศัตรูทุเรียนแบบผสมผสานเพื่อเสริมประสิทธิภาพการผลิตทุเรียนคุณภาพ

•การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูทุเรียนโดยวิธีผสมผสาน.....333

โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

- ชีววิทยาของเชื้อ *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรคเน่าทุเรียนและการแพร่ระบาดของโรค

•การศึกษาความรุนแรงของเชื้อรา *Phytophthora* palmivora.....342

บนส่วนต่างๆ ของทุเรียน

โดย นางสาวพจนา ตระกูลสุขรัตน์ และคณะ

ส้มโอ : วิจัยและพัฒนาการอารักขาส้มโอ

- การป้องกันกำจัดแมลงและไรศัตรูส้มโอ

•การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัด.....356

ไรขาวพริกในส้มโอและผลกระทบต่อศัตรูธรรมชาติ

โดย นายเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และคณะ

ลองกอง : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านการผลิตลองกอง

- วิจัยด้านอารักขาพืช เพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตลองกอง

•การศึกษาชนิด ปริมาณ และฤดูกาลระบาดของหนอนกินใต้.....369

เปลือกลองกอง

โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

- การศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงบางชนิดในการป้องกัน.....378
กำจัดหนอนกินใต้เปลือกลองกอง
โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

มะม่วง : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงสดเพื่อส่งออกในเชิงธุรกิจ

- การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตมะม่วงสดอย่างถูกต้องและเหมาะสม
เพื่อการส่งออก

- การป้องกันกำจัดศัตรูมะม่วง (สด) โดยวิธีผสมผสาน.....386
โดย นางสาวสราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

: วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงแก้วเพื่อแปรรูปในเชิงอุตสาหกรรม

- การทดสอบเทคโนโลยีการผลิตมะม่วงแก้วอย่างถูกต้องและเหมาะสม

- ทดสอบเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูมะม่วงเพื่อการแปรรูป.....397
แบบผสมผสาน
โดย นางสาวสราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

ส้มเขียวหวาน : วิจัยและพัฒนาการอารักขาส้มเขียวหวาน/เปลือกล่อนเพื่อเพิ่ม
ผลผลิตและลดการสูญเสีย

- วิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดแมลง และไรศัตรูส้มเขียวหวานที่
เหมาะสมเพื่อการเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ

- ทดสอบการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูส้มเขียวหวานปลอดโรคโดย.....407
วิธีผสมผสาน
โดย นางสาวอรุณี วงษ์กอบรัษฎ์ และคณะ

- ชีววิทยาด้วงปีกแข็ง แมลงศัตรูส้มเขียวหวานและการป้องกันกำจัด.....414
โดย นางสาวอรุณี วงษ์กอบรัษฎ์ และคณะ

- การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา และการป้องกันกำจัดแมลง และ.....430
ไรศัตรูส้มเขียวหวานสำหรับจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชเพื่อการส่งออก
โดย นางสาวอรุณี วงษ์กอบรัษฎ์ และคณะ

- การศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำต่อประสิทธิภาพของ.....437
สารฆ่าไร สำหรับการป้องกันกำจัดไรแดงแอฟริกัน
โดย นายเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และคณะ

พืชผัก เห็ด และพืชหัวอื่นๆ

พริก : เทคโนโลยีการผลิตพริกเพื่อการส่งออก

- วิจัยและพัฒนาการบริหารกำจัดโรคพริก

• การบริหารโรคกุ้งแห้งของพริก.....456

โดย นางสาวอรพรรณ วิเศษสังข์ และคณะ

• ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อ *Colletotrichum* spp.....467

Isolate ต่างๆ บนผลพริกและปฏิกิริยาของพริกบาง isolate ต่อ

โรคกุ้งแห้ง

โดย นางสาวอรพรรณ วิเศษสังข์ และคณะ

ขิง : เทคโนโลยีการผลิตขิงเพื่อการส่งออก

- การป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของขิง

• การตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว หรือ.....481

แง่งเน่าของขิงโดยเทคนิค พีซีอาร์ ด้วยโพลีกาแลคตูโลเนสยีน

โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ

กระเจี๊ยบเขียว : เทคโนโลยีการผลิตกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออก

- การวิจัยและพัฒนาด้านอารักขาพืชเพื่อการส่งออก

• การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงและสารสกัดสะเดา.....497

ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้ายในกระเจี๊ยบเขียว

โดย นางอุราพร หนูนารถ และคณะ

ถั่วลันเตา : เทคโนโลยีการผลิตถั่วลันเตา

- การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลันเตาเพื่อต้านทานโรคสำคัญ

• การปรับปรุงพันธุ์ถั่วลันเตาเพื่อต้านทานต่อโรคราแป้ง.....502

โดย นายศิริพงษ์ คุ้มภัย และคณะ

เห็ด : เทคโนโลยีการผลิตเห็ดสกุลนางรม

- วิจัยและพัฒนาการอารักขาเห็ดสกุลนางรม

• การป้องกันกำจัดไรดีดในเห็ดนางรม.....518

โดย นายเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และคณะ

มะเขือเทศ : การวิจัยเทคโนโลยีการผลิตมะเขือเทศ

- การแก้ไขปัญหาศัตรูมะเขือเทศที่สำคัญ

•ศึกษาการแพร่กระจายของแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci*.....533
(Gennadius) และการสุ่มตัวอย่างในมะเขือเทศ
โดย นางสาวศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย และคณะ

•ศึกษาการชดเชยต่อการสูญเสียใบมะเขือเทศในการเจริญเติบโต.....551
ระยะต่างๆ ต่อการทำลายของแมลงศัตรูพืช
โดย นางสาวศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย และคณะ

- การควบคุมวัชพืชในมะเขือเทศ

•ศึกษาช่วงวิกฤตของการแข่งขันระหว่างวัชพืชกับมะเขือเทศ.....559
โดย นางสาวเพ็ญศรี นันทสมสราญ และคณะ

ถั่วฝักยาว : เทคโนโลยีการผลิตพืชผักเศรษฐกิจ

- เทคโนโลยีการผลิตถั่วฝักยาว

•การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลง เชื้อแบคทีเรีย และ.....576
สารสกัดสะเดาในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะฝักถั่วในถั่วฝักยาว
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

ไม้ดอก-ไม้ประดับ

กล้วยไม้ : วิจัยเพิ่มผลผลิตและมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้

- วิจัยการแก้ปัญหาเพลี้ยไฟกล้วยไม้ที่มีผลต่อการผลิตและการส่งออก

•การป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟฝ้ายบนกล้วยไม้โดยวิธีผสมผสาน.....592
โดย นางปิยรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ

•ผลของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดต่อการเจริญของเชื้อรา.....604
Colletotrichum gloeosporiodes (Penz) สาเหตุโรคเกสรดำใน
กล้วยไม้สกุลหวาย
โดย นางสาวทัศนาพร ทัศคร และคณะ

- วิจัยพัฒนาการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพกล้วยไม้

•ประสิทธิภาพเชื้อจุลินทรีย์ สารสกัดสะเดา และสารฆ่าแมลงใน.....612
การป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมในกล้วยไม้
โดย นายสมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ

•การเปลี่ยนแปลงประชากรของบั่วกล้วยไม้.....621
โดย นายสมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ

ปทุมมา : เพิ่มผลผลิตและมูลค่าการส่งออกปทุมมา/กระเจียว

- ศึกษาเทคโนโลยีด้านอารักขาและการบริหารศัตรูพืช

• การตรวจสอบเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว.....636
ของปทุมมาโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา
โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

กุหลาบ : บริหารศัตรูกุหลาบโดยวิธีผสมผสาน

- การป้องกันกำจัดไรศัตรูกุหลาบ

• การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัดไรสองจุด.....648
ในกุหลาบ
โดย นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ

ลิลลี่ : วิจัยเพิ่มผลผลิตเพื่อการนำเข้าลิลลี่

- การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูลิลลี่

• โรคใบด่างของลิลลี่.....656
โดย นางสุรภี กีรติยะอังกูร และคณะ

พืชสมุนไพร/เครื่องเทศ

พริกไทย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพริกไทยเพื่อการส่งออก

- วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีด้านอารักขาพริกไทย เพื่อลดความ
เสียหายจากศัตรูพืช

• ศึกษาการใช้สารฆ่าแมลงและน้ำมันธรรมชาติบางชนิดเพื่อ.....670
ป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งพริกไทย
โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

กระวาน/เร่ว : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกระวาน เร่ว และกระวานเทศ

- วิจัยและพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงของกระวาน เร่ว และ
กระวานเทศ

• ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงและสารสกัดสะเดาเพื่อ.....675
ป้องกันกำจัดหนอนเจาะลำต้นในกระวาน
โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

พืชสวนอุตสาหกรรม

ปาล์มน้ำมัน : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปาล์มน้ำมัน

- การจัดการศัตรูปาล์มน้ำมันที่เหมาะสม

• การบังคับการออกดอกและติดเมล็ดของพืชคลุมซีรูเลียมด้วย.....677
สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช
โดย นางสาวพัชรินทร์ วณิชย์อนันตกุล และคณะ

• การควบคุมวัชพืชบริเวณรอบโคนต้นปาล์มน้ำมันปลูกใหม่ด้วย.....689
สารกำจัดวัชพืช
โดย นางสาวพัชรินทร์ วณิชย์อนันตกุล และคณะ

กาแฟ : วิจัยและเพิ่มผลผลิตกาแฟอาราบิก้า

- วิจัยด้านอารักขาพืช

• ศึกษาสาเหตุและความรุนแรงของโรคเน่าดำของกาแฟอาราบิก้า.....705
โดย นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และคณะ

วิทยาการเฉพาะด้าน

วิทยาการเฉพาะด้าน : ความหลากหลายทางชีวภาพ

- อนุกรมวิธาน และการเก็บรักษาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ

• ชนิดและเขตแพร่กระจายของเพลี้ยไฟสกุล *Frankilniella*.....714
โดย นางศิริณี พูนไชยศรี และคณะ

• การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งศัตรูมังคุด.....723
โดย นางชลิดา อุณหวุฒิ และคณะ

• การศึกษาอนุกรมวิธานของเพลี้ยแป้งศัตรูลองกอง.....744
โดย นางชลิดา อุณหวุฒิ และคณะ

• อนุกรมวิธานของมวนง่าม.....765
โดย นางสมหมาย ชื่นราม และคณะ

• การศึกษาชนิดของแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์.....774
โดย นายสุทธิสันต์ พิมพะสาลี และคณะ

• อนุกรมวิธานของไรบนผลผลิตทางการเกษตร.....792
โดย นางวัฒนา จารณศรี และคณะ

• การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนพืชสมุนไพร.....802
โดย นางวัฒนา จารณศรี และคณะ

- การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มเขียวหวาน.....811
  โดย นางวิภาดา วังศิลาบัตร และคณะ
- การศึกษาชนิด นิเวศวิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุม.....835
  ต่อแมลงวันผลไม้
  โดย นางวิภาดา วังศิลาบัตร และคณะ

- อนุกรมวิธาน และการเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชเพื่อการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

- อนุกรมวิธานและการเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชเพื่อการอนุรักษ์.....848
  อย่างยั่งยืน
  โดย นางพัฒนา สนธิรัตน และคณะ
- การจำแนกและเก็บรักษารา *Rhizoctonia* สาเหตุโรคพืช.....872
  โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- รวบรวมและจำแนกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรค.....894
  แอนแทรคโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจ
  โดย นางสาวธารทิพย ภาสบุตร และคณะ
- วิธีการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรค.....910
  สแคปขององุ่น
  โดย นายยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
- รวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Fusarium* สาเหตุโรคชนิด.....917
  ต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจ
  โดย นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
- รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย.....932
  Xanthomonas campestris pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ใน
  ประเทศไทย และการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟิน และ
  น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
  โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- ศึกษาชนิด race ชนิด biova การตอบสนองต่อปฏิกิริยาทาง.....949
  เซรุ่มวิทยาและวิธีเก็บรักษาเชื้อ *Pseudomonas (Ralstonia)*
  solanacearum สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดใน
  ประเทศไทย
  โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

•ชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ.....980
Xanthomonas campestris pv. *vesicatoria* ด้วยเทคนิค Rep-PCR
โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ
- ศึกษาการใช้ประโยชน์ของสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas*
•คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่มี.....1000
ประสิทธิภาพสูงในการสร้างแซนแทนกัม
โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
•การพัฒนาสูตรอาหาร Wakimoto ที่เหมาะสมในการสร้าง.....1011
สารแซนแทนกัมของแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas*
โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
•ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารแซนแทนกัมของ 1019
แบคทีเรียสกุล *Xanthomona*s
โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
: วิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากแมลงห้ำและไรตัวห้ำ
- ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ประสิทธิภาพ และการใช้ประโยชน์จากแมลง
ห้ำและไรตัวห้ำ
•การควบคุมไรแดงศัตรูส้มและแมลงปากดูดบางชนิดโดยวิธีการ.....1028
ให้น้ำและการใช้ไรตัวห้ำในส้มเขียวหวาน
โดย นางสาวมานิตา คงชื่นสิน และคณะ
•ศึกษาประชากรตามฤดูกาลของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* 1039
Karny และแมลงศัตรูธรรมชาติในมะเขือ
โดย นางประภัสสร เชยคำแหง และคณะ
- การขยายแมลงห้ำและไรตัวห้ำ
•พัฒนารูปแบบผลิตขยายมวนพิฆาต (*Eoanthecona furcellata* 1050
(Wolff))
โดย นางรัตนา นชะพงษ์ และคณะ
•การพัฒนารูปแบบการผลิตไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก.....1064
โดย นางสาวมานิตา คงชื่นสิน และคณะ
•การพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ, *Amblyseius* 1068
cucumeris
โดย นางสาวมานิตา คงชื่นสิน และคณะ

: วิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากแมลงเบียน

- การผลิตขยายแมลงเบียน

  - พัฒนารูปแบบการผลิตและการใช้แตนเบียนชนิดต่างๆ.....1070
    เพื่อใช้ในการควบคุมหนอนชอนใบส้ม
    โดย นายรุจ มรกต และคณะ
  - การพัฒนารูปแบบการผลิตและการใช้แตนเบียนชนิดต่างๆ.....1077
    ในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้ม
    โดย นายรุจ มรกต และคณะ

: วิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์โรคของแมลง

- การสำรวจและรวบรวม ตรวจ จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และไวรัส Nuclear Polyhedrosis Virus

  - การตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์เซลล์แมลงศัตรูพืชด้วยวิธี.....1090
    Isozyme analysis
    โดย นางสาวสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และคณะ
  - ทดสอบประสิทธิภาพเซลล์หนอนกระทู้ผักเพาะเลี้ยงในการ.....1096
    สร้างผลึกโปรตีน SINPV
    โดย นางสาวสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และคณะ

- การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ประสิทธิภาพ และการใช้ประโยชน์จาก แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และไวรัส Nuclear Polyhedrosis Virus

  - ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของไวรัส *Helicoverpa*.....1098
    armigera NPV กับหนูนอร์เว (*Rattus norvegius*)
    สายพันธุ์ Wistar
    โดย นางกรแก้ว เสือสะอาด และคณะ

- การผลิตขยายเชื้อไวรัส Nuclear Polyhedrosis Virus และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

  - โรงงานต้นแบบผลิตเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*.....1133
    โดย นางสาวอัจฉรา ตันติโชดก และคณะ

: การวิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

- การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ประสิทธิภาพจากการใช้ประโยชน์จาก ไส้เดือนฝอย

• ทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ของ.....1148
ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
โดย นางวัชรี สมสุข

: วิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากปรสิตและศัตรูธรรมชาติในการกำจัดสัตว์ศัตรูพืช

- วิจัยและพัฒนาค็อกซิเดียนโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็น
สารกำจัดหนู

• ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์.....1160
โรซีสต์ต่อปลาและกระต่าย
โดย นางสาวยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และคณะ

: วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

- ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา และการป้องกันกำจัดแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช

• การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยสารสกัดว่านน้ำ.....1166
โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

• การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัด.....1168
จากพืชต่างๆ ที่มีในประเทศไทยในการควบคุมและ
กำจัดหอยเชอรี่
โดย นางสาวชมพูนุท จรรยาเพศ และคณะ

• ประสิทธิภาพของสารสกัดมะคำดีควายกับสารไดเอทธิลมาเลท.....1175
ต่อหอยเชอรี่และผลกระทบต่อปลานิล
โดย นายปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

• ผลของสารสกัดจากพืชต่อหนูท้องขาวบ้าน *Rattus rattus*.....1183
โดย นายปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

- วิจัยและพัฒนาตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืช และสารพิษจากเชื้อรา

• การตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในน้ำด้วยวิธี ELISA.....1188
โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

- ชีววิทยาวัชพืชและการแพร่กระจายของเมล็ดวัชพืช

• ชีววิทยาและการเจริญเติบโตของกระชับ.....1200
โดย นางจันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ และคณะ

: วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชและตรวจสอบพืชที่ได้รับการ
ตัดต่อสารพันธุกรรม

- การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรค Bacterial Spot มะเขือเทศและพริก

• การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ 1206
โดย นางณัฏฐพร อุทัยมงคล และคณะ

- การถ่ายทอดโรคโดยทางเมล็ดพันธุ์ของเชื้อ Squash Mosaic Virus ในพืชตระกูลแตงบางชนิด

• ศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ Squash Mosaic Virus ของพืชตระกูลแตงบางชนิด 1227
โดย นางสาวชลธิชา รักใคร่ และคณะ

: ศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงของพืชและศัตรูพืชจากต่างประเทศ

- ศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงของวัชพืชสำคัญด้านกักกันพืช

• ชีพจักรและการแพร่พันธุ์ของวัชพืชต่างถิ่น 1237
โดย นางสาวนงพร มาอยู่ดี และคณะ

เทคโนโลยีชีวภาพ

: วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชโดยการตัดต่อสารพันธุกรรม

- การพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน

• การพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน 1244
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ

: การพัฒนาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* spp. สายพันธุ์ไทยที่ควบคุมแมลงศัตรูพืช

• การพัฒนาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* spp. สายพันธุ์ไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช 1275
โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ

: การพัฒนาและปรับใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการจำแนกศัตรูพืช

- การจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราสนิมถั่ว (*Phakopsora pachyrhizi*) โดยใช้ลายพิมพ์ DNA

•การจำแนกสายพันธุ์เชื้อราสนิมถั่วเหลือง (*Phakopsora*.....1343
pachyrhizi) โดยใช้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ และลำดับเบส
โดย นางสาวศรีสุข พูนผลกุล และคณะ
- การจำแนกสายพันธุ์เชื้อราไฟทอพธอราสาเหตุโรคพืชโดยใช้ลายพิมพ์
ดี เอ็น เอ
•การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora* spp. 1356
สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าโดยใช้ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ
โดย นางสาวศรีสุข พูนผลกุล และคณะ
: การพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูวิทยา
- การตรวจสอบศัตรูพืชด้วยวิธีเซรุ่มวิทยา
•การผลิตโมโลโคลนอล แอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ.....1367
Ralstonia solanacearum และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA
โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

อารักขาพืชเพื่อการส่งออก (ไม้ผล 5 ชนิด มังคุด ส้มโอ ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง)
มังคุด : การแก้ไขปัญหาศัตรูมังคุดเพื่อการส่งออกไปประเทศที่พัฒนาแล้ว
- ประสิทธิภาพของวิธีอบอากาศร้อนในการกำจัดแมลงวันทองในมังคุด
•ประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์.....1387
ในการกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุด
โดย นายอุดร อุณหวุฒิ และคณะ
: โครงการอนุกรมวิธานและการป้องกันกำจัดเพื่อประเมินความเสี่ยงของศัตรูไม้ผลส่งออก
- การศึกษาชนิดของแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัดใน
ไม้ผลเพื่อการส่งออก
•การศึกษาชนิดของไรศัตรูไม้ผลเพื่อการส่งออก.....1399
โดย นางวัฒนา จารณศรี และคณะ
•การศึกษาชีววิทยา และการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูไม้ผล.....1413
5 ชนิด (ลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุด มะม่วง) เพื่อการทำบัญชี
รายชื่อศัตรูพืชในไม้ผลส่งออก
โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

- การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัด.....1424
ไรลำไย
โดย นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ
- การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัด.....1427
ไรขาวในมังคุด
โดย นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ
- ชีววิทยา การแพร่กระจาย และการป้องกันกำจัดหอยทาก.....1432
และทากในไม้ผลส่งออก
โดย นางสาวชมพูนุท จรรยาเพศ และคณะ

- ศึกษาชนิดและการป้องกันกำจัดโรคไม้ผลเพื่อการส่งออก
- การจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุและความรุนแรงของโรคลำไย.....1439
โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

ลดการใช้สารเคมี

ลดการใช้สารเคมี : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อสนับสนุนการป้องกันกำจัด
ศัตรูพืชแบบผสมผสาน

- การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูผักตระกูลกะหล่ำเพื่อสนับสนุนเทคโนโลยี
การป้องกันกำจัดแบบผสมผสาน
- ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก.....1454
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ
- ประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก.....1465
ในกะหล่ำปลี
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ
- ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงเพื่อป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอด.....1476
กะหล่ำ
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ
- ประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และสารฆ่าแมลงในการ.....1486
ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และคณะ

- ศึกษาประสิทธิภาพและระยะเวลาที่เหมาะสมในการพ่นสาร.....1493
  ฆ่าแมลงป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้าและผลต่อศัตรูธรรมชาติ
  โดย นางสาววิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ
- ศึกษาประสิทธิภาพการพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเครื่อง.....1501
  พ่นสารแบบต่างๆ เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า
  โดย นางจีรนุช เอกอำนวย และคณะ
- การบริหารความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผัก.....1514
  ในพืชตระกูลกะหล่ำ
  โดยนางพรรณเพ็ญ ชโยภาส และคณะ

: ทดสอบเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน

- ทดสอบเพื่อพัฒนาการใช้เทคโนโลยีเฉพาะด้านในการป้องกันกำจัดศัตรู
  พืชแบบผสมผสานที่เหมาะสม

- การป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน.....1525
  โดย นางปิยรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ
- การทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดย.....1544
  วิธีผสมผสาน
  โดย นายสุพจน์ กิตติบุญญา และคณะ
- ทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน.....1560
  โดย นางปิยรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ
- การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำดอกโดยวิธีผสมผสาน.....1580
  โดย นางปิยรัตน์ เขียนมีสุข และคณะ
- การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะม่วงโดยวิธีผสมผสาน.....1596
  โดย นางสาวสราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

อนุกรมวิธานของมวนง่าม

Taxonomy of Striped Shield Bug, *Tetroda* sp.

สมหมาย ชื่นราม ณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม
ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี

กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กองกีฏและสัตววิทยา

บทคัดย่อ

จากการสำรวจรวบรวมตัวอย่างมวนง่าม ในพื้นที่ปลูกข้าวนาปีและนาปรังในภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2544 ถึง กันยายน 2546 พบมวนง่ามในพื้นที่ปลูกข้าว จังหวัดขอนแก่น อุบลราชธานี หนองคาย เชียงใหม่ และพัทลุง นำตัวอย่างมวนง่ามมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ กองกีฏและสัตววิทยา เพื่อจำแนกชนิด โดยวิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดใต้กล้องจุลทรรศน์ ชนิด sterco microscope รวมทั้งศึกษาจากตัวอย่างที่มีอยู่ในพิพิธภัณฑ์แมลง พบมวนง่ามทั้งหมด 4 ชนิด คือ *Tetroda denticufifera* Bergroth, *Tetroda histeroides* Fabricius, *Tetroda tranversalis* Westwood และ *Tetroda* sp.

การศึกษาครั้งนี้ได้จัดทำแนวทางการวินิจฉัยชนิด (key) พร้อมภาพประกอบลักษณะสำคัญ และรายละเอียด (description) ของมวนง่าม

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06013 001

คำนำ

มวนง่าม เป็นแมลงปากดูด จัดอยู่ในอันดับ (Order) Hemiptera วงศ์ (Family) Pentatomidae เป็นแมลงศัตรูสำคัญชนิดหนึ่งของข้าว โดยดูดกินน้ำเลี้ยงจากลำต้นและใบข้าว ในระยะกล้า ระยะปักดำ และระยะข้าวออกรวง ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ข้าวโดยทำให้ข้าวใบเหลืองแห้งคล้ายกับเป็นโรคขอบใบแห้ง และแสดงอาการเหี่ยวเฉาตายในที่สุด (ถนอมจิตต์, 2542) ซึ่งเป็นปัญหาแก่เกษตรกรผู้ปลูกข้าว เนื่องจากทำให้ผลผลิตลดลง ปัจจุบันพบการระบาดของมวนง่ามในพื้นที่ปลูกข้าวภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และมีแนวโน้มจะเพิ่มปริมาณและขยายพื้นที่การระบาดทำความเสียหายอย่างกว้างขวาง เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษาชนิดของมวนง่าม ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธาน พืชอาศัย เขตการแพร่กระจาย ของมวนง่ามในครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันกำจัดมวนง่ามได้อย่างเหมาะสมถูกวิธีและมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างมวนง่ามในพื้นที่ปลูกข้าวนาปีและนาปรังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคใต้ และภาคกลางของประเทศไทย พร้อมเครื่องมือจับแมลง เช่น สวิง ปากคีบ กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope สารเคมี เช่น alchohol 75%, ethyl acetate อุปกรณ์ใช้ในการถ่ายภาพตัวอย่างมวนง่าม ได้แก่ กล้องถ่ายรูป ฟิล์มสไลด์ ฟิล์มสี อุปกรณ์ในการวาดรูป camera lucida หนังสือวิชาการที่ใช้ประกอบการจำแนกชนิดมวนง่าม

วิธีการ

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างมวนง่าม ในพื้นที่ปลูกข้าวนาปีและนาปรังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคใต้ และภาคกลางของประเทศไทย และบันทึกข้อมูล วัน เดือน ปี และสถานที่เก็บตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย จำนวนตัวอย่างที่พบ นำตัวอย่างแมลงกลับมายังห้องปฏิบัติการ กองกีฏและสัตววิทยา จัดรูปร่าง (set) เพื่อจำแนกชนิด โดยดูลักษณะต่างๆ จากกล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope วาดภาพแสดงลักษณะที่สำคัญที่ใช้จำแนกชนิดและรายละเอียดของมวนง่ามแต่ละตัว

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2544 - กันยายน 2546

สถานที่ 1. ในพื้นที่ปลูกข้าวนาปีและนาปรังในภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย

2. ห้องปฏิบัติการ กองกีฏและสัตววิทยา

ผลการทดลองและวิจารณ์

มวนง่ามเป็นแมลงในอันดับ Hemiptera วงศ์ Pentatomidae พบเข้าทำลายต้นข้าวและใบข้าว ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคใต้ และภาคกลางของประเทศไทย พบมวนง่าม 4 ชนิด คือ *Tetroda denticufifera* Bergroth, *Tetroda histeroides* Fabricius, *Tetroda tranversalis* Westwood และ *Tetroda* sp.

รูปร่างลักษณะของมวนง่ามในสกุล *Tetroda* (ภาพที่ 1)

มวนง่ามเป็นมวนขนาดกลาง ตัวเต็มวัยมีขนาดลำตัวกว้าง 6 – 10 มิลลิเมตร ยาว 15 – 20 มิลลิเมตร มีลักษณะคล้ายโล่เหมือนมวนทั่วไปในวงศ์ Pentatomidae มีสีน้ำตาลแกมเหลือง สีน้ำ - ตาลเข้ม และสีดำ มีปากแบบเจาะดูด (Piereing-sucking type) ประกอบกันเป็นท่อยาวยื่นออกมาจากปลายส่วนหัวและพับเก็บไว้ด้านล่างของลำตัว หนวดเป็นแบบเส้นด้าย (Filiform) มี 5 ปล้อง สีน้ำตาล น้ำตาลเข้ม หรือสีดำ หัว (Head) ส่วน jugum มีลักษณะเป็นหนามแหลมยื่นไปด้านหน้า คล้ายง่ามสันอกปล้องแรก (Pronotum) สีน้ำตาลแกมเหลือง สีน้ำตาลแดง สีน้ำตาลเข้ม และสีดำ ด้านหน้ามีหนามแหลมและยื่นออกไปข้างหน้าทั้ง 2 ข้าง ปีก 2 คู่ ปีกคู่หน้าส่วนโคนมีลักษณะเป็นแผ่นแข็งทึบ (Corium) สีน้ำตาลจนถึงสีดำ ส่วนปลายปีกมีลักษณะเป็นแผ่นบางอ่อนใส (Membrane) มีเส้นปีก (Viens) มองเห็นชัดเจน ปีกคู่หลังเป็นแผ่นบางตลอดทั้งปีก โคนปีกคู่หน้าจะแยกออกจากกันโดยมีแผ่นแข็งสามเหลี่ยม (Scutellum) กั้นอยู่ตรงกลาง มีลักษณะเรียวยาวลงไปประมาณกึ่งกลางของลำตัวมักมีสีเดียวกับอกปล้องแรก

แนวทางการวินิจฉัยชนิดของมวนง่าม

1. – Jugum สีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเป็นง่าม มีความยาวน้อยกว่าความกว้างของส่วนหัว (ภาพที่ 2ก.), Pronotum สีน้ำตาลเข้ม ส่วนหน้ายื่นออกไปเป็นง่าม ส่วนปลายของง่ามโค้งเข้าหาส่วนหัว (ภาพที่ 3ก.)……...…….……. ***Tetroda tranversalis***
   – Jugum สีอื่น มีลักษณะเป็นง่าม มีความยาวมากกว่าความกว้างของส่วนหัว (ภาพที่ 2ข.), Pronotum มีสีอื่น ส่วนหน้ายื่นออกไปเป็นง่าม ส่วนปลายของง่ามเบนออกจากส่วนหัว (ภาพที่ 3ข.)……...……. **2**
2. – Scutellum มีแถบสีเหลืองทอดตามแนวยาว ด้านข้าง ข้างละ 1 แถบ (ภาพที่ 4ก)…***T. histeroides***
   – Scutellum ไม่มีแถบสีเหลือง (ภาพที่ 4ข.)……...…….**3**
3. – หนวดปล้องที่ 1 – 5 มีสีน้ำตาลแกมเหลือง ปีก ส่วนของ corium มีสีน้ำตาลแกมเหลือง เนื้อปีกสีเหลืองอ่อน เส้นปีก สีน้ำตาลอมเหลือง…….……***T. denticufifera***
   – หนวดปล้องที่ 1 – 4 มีสีดำ ปลายหนวดปล้องที่ 5 มีสีน้ำตาลเข้ม ปีกส่วนของ corium สีดำเนื้อ ปีกสีเทาขาว เส้นปีกสีดำ …….……***Tetroda* sp.**

รายละเอียดของมวนง่ามแต่ละชนิด

***Tetroda denticufifera* Bergroth**

(Fig. 5ก.)

ชื่อสามัญมวนง่าม

รูปร่างลักษณะ

ลำตัว เป็นมวนขนาดกลาง กว้าง 7 – 9 มิลลิเมตร ยาว 18 – 20 มิลลิเมตร สีน้ำตาลแกมเหลือง

หัว ส่วนหัวบริเวณ Jugum ยื่นออกไปเป็นง่ามปลายแหลม 2 ง่าม มีสีน้ำตาลแกมเหลือง หนวดมี 5 ปล้อง ทุกปล้องมีสีน้ำตาลอมเหลือง

อก **อกปล้องแรก สีน้ำตาลแกมเหลือง ด้านหน้าของอกปล้องแรกมีลักษณะเป็นหนามแหลมยื่นไปด้านหน้าทั้ง 2 ข้าง ระยะห่างของมุมอกปล้องแรก 6 มิลลิเมตร แผ่นแข็งสามเหลี่ยมสันหลัง มีสีน้ำตาลแกมเหลือง ส่วนฐานกว้าง 5 มิลลิเมตร ยาว 7 มิลลิเมตร ปีก โคนปีกคู่หน้า สีน้ำตาลแกมเหลือง ปลายปีก สีเหลืองอ่อน เส้นปีกสีน้ำตาลแกมเหลือง ขามีสีน้ำตาลแกมเหลือง**

ท้อง สีน้ำตาลแกมเหลือง

เขตการแพร่กระจาย จังหวัดหนองคาย

***Tetroda histeroides* Fabricius**

(Fig. 5ข.)

***Aelia furcata* Fabricius, 1803**

***Meyarhynchus guadripinosas* Westn, 1837**

***Tetroda bilineata* Walk, 1868**

ชื่อสามัญมวนง่าม

รูปร่างลักษณะ

ลำตัว เป็นมวนขนาดกลาง กว้าง 7 – 8 มิลลิเมตร ยาว 15 – 18 มิลลิเมตร สีน้ำตาลแดง

หัว ส่วนหัวบริเวณ Jugum ยื่นออกไปเป็นง่ามปลายแหลม 2 ง่าม มีสีน้ำตาลแดง หนวด 5 ปล้อง สีแดงเข้มค่อนข้างดำ

อก อกปล้องแรก สีน้ำตาลแดง ด้านหน้ามีลักษณะเป็นหนามแหลมยื่นไปข้างหน้าทั้ง 2 ข้าง ระยะห่างของมุมอกปล้องแรก 6 มิลลิเมตร แผ่นแข็งสามเหลี่ยมสันหลัง สีน้ำตาลแดงค่อนข้างดำ ส่วนฐานกว้าง 4 มิลลิเมตร ยาว 6 มิลลิเมตร ด้านข้างของแผ่นแข็งสันหลังสามเหลี่ยม มีแถบสีเหลือง ทอดตามแนวยาว 2 เส้น ปีก โคนปีกคู่หน้า สีน้ำตาลแดงค่อนข้างดำ ปลายปีกคู่หน้าสีเทาอ่อน เส้นปีกสีเหลืองเข้ม ขาสีน้ำตาลแดง

ท้อง สีน้ำตาลแดง

เขตการแพร่กระจาย จังหวัดเชียงใหม่

***Tetroda tranversalis* Westwood**

(Fig. 5ค.)

ชื่อสามัญ มวนง่าม

รูปร่างลักษณะ

ลำตัว เป็นมวนขนาดกลาง กว้าง 9 – 10 มิลลิเมตร ยาว 18 – 20 มิลลิเมตร สีน้ำตาลเข้ม

หัว ส่วนหัวบริเวณปลาย Jugum ยื่นออกไปเป็นง่าม มีขนาดสั้นและปลายโค้งมน หนวดปล้องที่ 1 – 4 สีน้ำตาลอมเหลือง ปลายหนวดปล้องที่ 5 สีค่อนข้างดำ

อก **อกปล้องแรก สีน้ำตาลเข้ม ด้านหน้าของอกปกแรกเป็นหนามยื่นออกไปทั้ง 2 ข้างมีลักษณะมนและสั้น ระยะห่างของมุมอกปล้องแรก 5 มิลลิเมตร แผ่นแข็งสามเหลี่ยมสันหลัง สีดำขอบด้านข้างมีสีน้ำตาล ฐานกว้าง 5 มิลลิเมตร ยาว 6 มิลลิเมตร ปีก โคนปีกคู่หน้า สีน้ำตาลเข้ม ปลายปีกสีเทาออกขาว เส้นปีกสีน้ำตาลเข้ม ขา สีน้ำตาลเข้ม**

ท้อง สีน้ำตาลเข้ม

เขตการแพร่กระจาย จังหวัดพัทลุง

***Tetroda* sp.**

(Fig. 5ง.)

ชื่อสามัญ มวนง่าม

รูปร่างลักษณะ

ลำตัว เป็นมวนขนาดกลาง กว้าง 6 – 7 มิลลิเมตร ยาว 16 – 17 มิลลิเมตร สีดำ

หัว หนวดปล้องที่ 1 – 4 สีดำ ปลายหนวดปล้องที่ 5 สีน้ำตาลเข้ม

อก อกปล้องแรก มีสีดำ ด้านหน้าของอกปล้องแรกเป็นปลายแหลมยื่นออกไปเป็นทั้ง 2 ข้าง ระยะห่างของมุมอกปล้องแรก 5 มิลลิเมตร แผ่นแข็งสามเหลี่ยมสันหลังสีดำ ส่วนฐานกว้าง 4 มิลลิเมตร ยาว 6 มิลลิเมตร ปีก โคนปีกคู่หน้าสีดำ ปลายปีกคู่หน้าสีเทา เส้นปีกสีดำ ขามีสีดำ

ท้อง สีน้ำตาลเข้ม

เขตการแพร่กระจาย จังหวัดขอนแก่น อุบลราชธานี และหนองคาย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจรวบรวมตัวอย่างมวนง่าม จากแหล่งปลูกข้าวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคอื่นๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2544 ถึงกันยายน 2546 พบมวนง่าม จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Tetroda denticufifera* Bergroth, *Tetroda histeroides* Fabricius, *Tetroda tranversalis* Westwood และ *Tetroda* sp. โดยมวนง่ามทั้ง 4 ชนิด เข้าทำลายข้าวโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นข้าวและใบข้าว ในระยะกล้า ระยะปักดำ และในระยะข้าวออกรวง ทำให้ข้าวใบเหลืองแห้งคล้ายกับเป็นโรคขอบใบแห้ง และแสดงอาการเหี่ยวเฉาและตายในที่สุด จากข้อมูลทางด้านอนุกรมวิธานครั้งนี้ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐาน ที่ทำให้ทราบชนิด เขตการแพร่กระจาย ซึ่งสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการป้องกันจำกัดมวนง่ามในอนาคตต่อไป

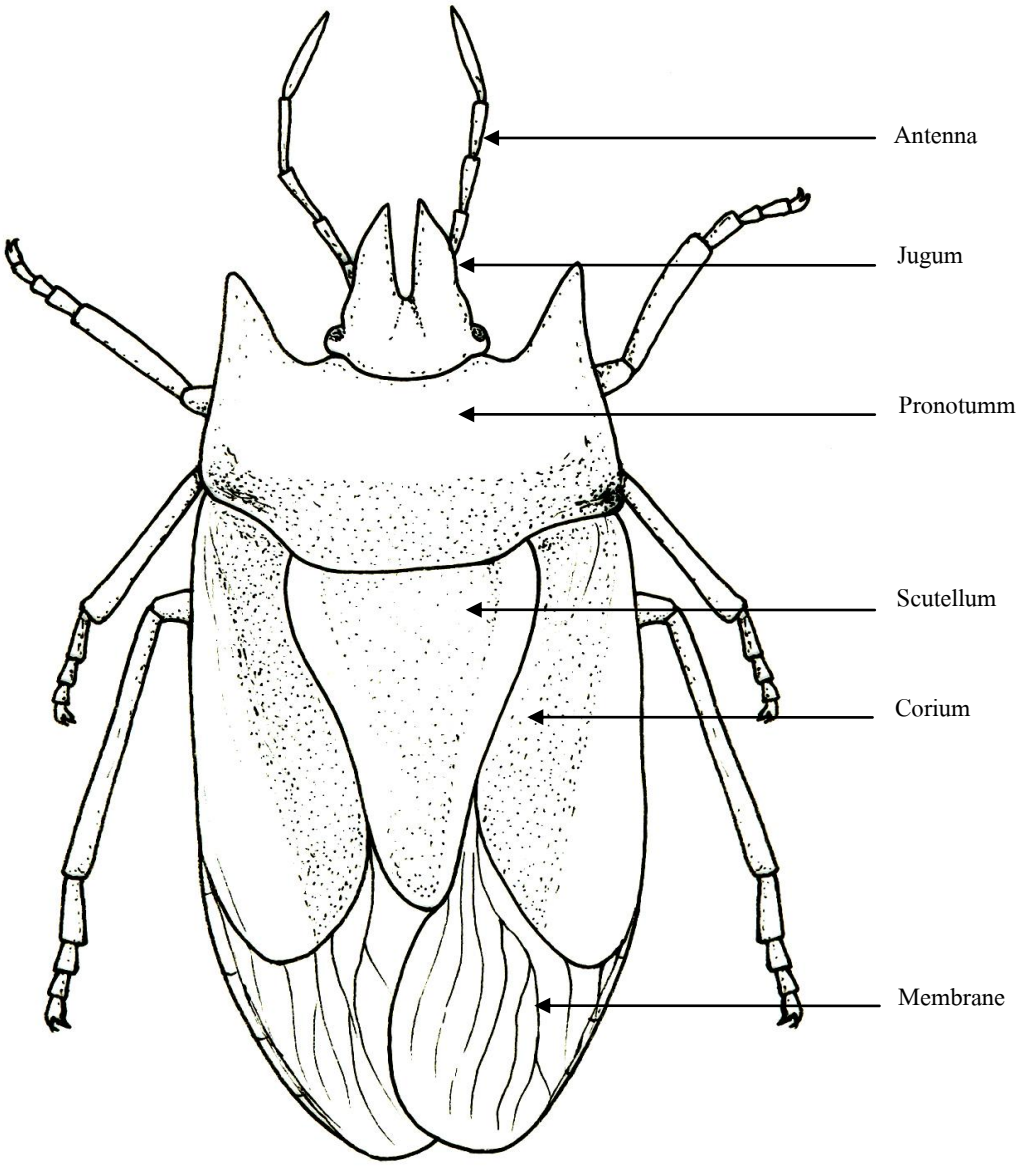
เอกสารอ้างอิง

ถนอมจิตต์ ฤทธิ์มนตรี. 2542. การระบาดทำลายข้าวของมวน *Tetroda* sp. ว. ข่าวศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี. 11(2) : 2 - 3

สุธรรม อารีกุล. 2506. แมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ตอน 1 มวน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 8. แผนกวิชากีฏวิทยาและโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 190 หน้า

Distant, W.L. 1902. Rhynchota.-Vol.I. (Heteroptera). The Fauna of British India, Including Ceylon and Burma. Ed. W.T.Blanford, eds. Taylor and francis. London. 438 p.

Grist, D.H. and R.J.A.W.Lever. 1969. Pests of rice Longmans, Green and Co., Ltd., London. 520 p.



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมวนง่าม

ก ข

ภาพที่ 2 ลักษณะ Jugum บริเวณส่วนหัว

ก. *Tetroda tranversalis* Westwood

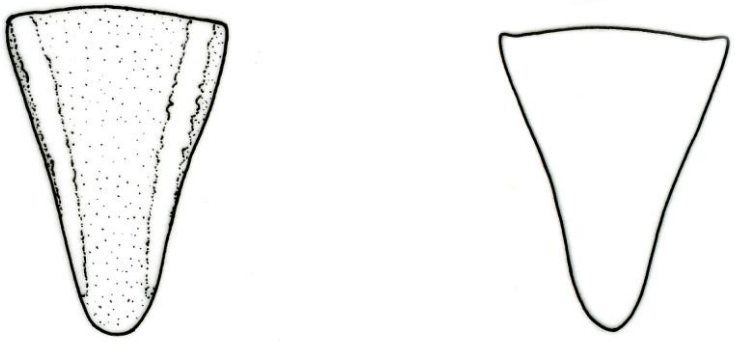
ข. *Tetroda sp.*

ก ข

ภาพที่ 3 ลักษณะอกปล้องแรก (Pronotum)

ก. *Tetroda tranversalis* Westwood

ข. *Tetroda sp.*



ก ข

ภาพที่ 4 ลักษณะแผ่นแข็งสามเหลี่ยม (Scutellum)

ก. *Tetroda histeroides* Fabricius

ข. *Tetroda denticufifera* Bergroth

ภาพที่ 5 ตัวเต็มวัยมวนง่าม

ก. *Tetroda denticufifera* Bergroth

ข. *Tetroda histeroides* Fabricius

ค. Tetroda tranversalis *Westwood*

ง. *Tetroda* sp.

การศึกษาชนิดของแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์

Study on The Rare and Endangered Insect Species

สุทธิสันต์ พิมพะสาลี ศิริณี พูนไชยศรี
สมหมาย ชื่นราม ชลิดา อุณหวุฒิ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี

กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กองกีฏและสัตววิทยา

บทคัดย่อ

จากการสำรวจรวบรวมแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ที่กำหนดไว้ตาม พ .ร.บ.สงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ .ศ. 2535 ตามพื้นที่ป่าไม้ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดต่างๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2544 ถึงเดือนกันยายน 2546 พบแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ จำนวน 23 ชนิด แบ่งเป็นผีเสื้อจำนวน 19 ชนิด ได้แก่ *Troides aeacus aeacus* (Felder & Felder), *Troides helena cerberus* (Felder & Felder), *Papilio palinurus palinurus* Fabricius, *Papilio protenor euprotenor* (Fruhstorfer), *Papilio paris paris* Linnaeus, *Bassarona recta monilis* Moore, *Kallima inachus siamensis* Fruhstorfer, *Cethosia bibilis perakana* Fruhtorfer, *Pareronia anais anais* (Bouge), *Thauria aliris pseudaliris* (Butler), *Stichophthalma louisa siamensis* Rothschild, *Surendra quercetorum quercetorum* (Moore), *Clanis titan* Rohschild & Jordan, *Eupanaca perfecta perfecta* (Butler), *Amplypterus mansoni* (Clerk), *Brahmaea wallichii wallichii* Gray, *Actias maenas* Doubleday, *Lyssa zampa* (Butler), *Gabala polyspilalis* Walker ด้วงจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Cheirotonus parryi* Gray, *Prosopocoilus (Cyclotropus) biplagistus nigripes* Boileau และ *Mouhotia batesi* Lewis และจักจั่นจำนวน 1 ชนิด คือ *Tosena fasciata* (Fabricius)

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06013 006

คำนำ

ประเทศไทยมีความหลากหลายทางด้านแมลงสูงทั้งด้านจำนวนชนิดและปริมาณ แมลงบางชนิดมีรูปร่างแปลกและสวยงามเป็นที่ต้องการและแสวงหาเพื่อสะสมไว้เป็นสมบัติส่วนตัวหรือซื้อขายแลกเปลี่ยน จึงมีการล่าจับแมลงกันมากเพื่อประโยชน์ทางการค้า จากการที่มีธุรกิจค้าแมลงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วนี้ ทำให้น่าเป็นห่วงว่าแมลงจะถูกจับไปเป็นจำนวนมาก อาจทำให้แมลงบางชนิดที่มีปริมาณน้อยอยู่แล้วในธรรมชาติสูญพันธุ์ไปได้ ดังนั้นจึงได้ดำเนินการศึกษาชนิดของแมลงอนุรักษ์โดยเฉพาะแมลงที่สวยงามและหายาก ซึ่งมีการล่า การค้ามากไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างแมลงที่สวยงามและหายาก
2. เครื่องมือจับแมลง เช่น สวิง ปากคีบ
3. กับดักแสงไฟ
4.เครื่องมือจัดรูปร่างแมลง

วิธีการ

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างแมลงตามสถานที่ต่างๆ โดยเฉพาะในเขตป่าอนุรักษ์ นำแมลงที่มีสีสันสวยงามหรือรูปร่างแปลกมาจำแนกชนิด ศึกษาข้อมูลของชนิดเหล่านั้นในพิพิธภัณฑ์แมลงกรมวิชาการเกษตร โดยดูปริมาณที่มีในพิพิธภัณฑ์ ปีที่จับได้ครั้งสุดท้าย ศึกษาค้นคว้าข้อมูลจากเอกสารต่างๆ ถึงสถานะภาพความมากน้อยของแมลงเหล่านี้ เช่น พบทั่วไปหรือหายาก รวมทั้งข้อมูลจากผู้ค้าแมลงทั้งในและต่างประเทศ บันทึกข้อมูลวันที่จับ สถานที่จับ ชื่อวิทยาศาสตร์

เวลาและสถานที่ เดือนตุลาคม 2544 ถึงเดือนกันยายน 2546

สำรวจตามพื้นที่ป่าไม้ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดต่างๆ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจรวบรวมแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ที่กำหนดไว้ตาม พ.ร.บ. สงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ตามพื้นที่ป่าไม้ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดต่างๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2544 ถึงเดือนกันยายน 2546 พบแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ จำนวน 23 ชนิด แบ่งเป็นผีเสื้อจำนวน 19 ชนิด ด้วงจำนวน 3 ชนิด และจักจั่นจำนวน 1 ชนิด ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

กลุ่มผีเสื้อ Order Lepidoptera

1. Family Papilionidae

1.1 *Troides helena cerberus* (Felder & Felder,1865) (Fig. 1-2)

Papilio cerberus Felder & Felder,1865

Troides spilotia Rothschild,1908

Papilio helena cerberus eumagos Jordan,1909

Papilio helena cerberus azelia Jordan,1909

Papilio helena cerberus gypsothelia Jordan,1909

Ornithoptera euthycrates Fruhstorfer,1913

Troides chongkiiakwangi Tung,1982

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : นครศรีธรรมราช นครนายก เชียงใหม่ ตาก จันทบุรี ระนอง ตรัง ปัตตานี สตูล

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย ภูฐาน บังคลาเทศ เมียนมาร์ ลาว กัมพูชา เวียตนาม จีน มาเลเซีย สิงคโปร์

1.2 *Troides aeacus aeacus* (Felder & Felder,1860) (Fig. 3-4)

Ornithoptera aeacus Felder & Felder,1860

Ornithoptera rhadamanthus var.thomsonii Bates,1875

Ornithoptera praecox Fruhstorfer,1913

Troides thibeticus Staudinger & O.Bang-Haas,1926

Papilio aeacus aeacus; Jordan,1908-1909

Papilio aeacus aeacus; Godfrey,1916

Papilio aeacus praecox; Godfrey,1927

Papilio aeacus praecox; Godfrey,1930

Troides aeacus praecox; Reeves,19XXa

Troides aeacus praecox; Pinratana,1977

Troides aeacus aeacus; Pinratana,1977

Troides aeacus aeacus; Pinratana,1992

Troides aeacus aeacus; Motono & Negishi,1989

Troides aeacus aeacus; Osada, Uemura & Uehara,1999

Papilio aeacus aeacus; Jordan,1908-1909

Papilio aeacus; Lemee,1950

Papilio aeacus aeacus; Metaye,1957

สถานที่พบ : อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : กรุงเทพมหานคร ชลบุรี นครนายก แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ พิษณุโลก ราชบุรี กาญจนบุรี จันทบุรี

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล ภูฐาน อินเดีย เมียนมาร์ ลาว กัมพูชา เวียตนาม จีน

1.3 *Papilio protenor euprotenor* (Fruhstorfer,1908) (Fig. 5)

Papilio euanthes Fruhstorfer,1908

Papilio sulpitius Jordan,1909

สถานที่พบ : อ.สังขละ จ.กาญจนบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เพชรบุรี พะเยาว์ เชียงใหม่ กาญจนบุรี อุทัยธานี

เขตการแพร่รกระจายต่างประเทศ : อินเดีย เนปาล ภูฐาน ลาว เวียตนาม จีน

1.4 *Papilio palinurus palinurus* Fabricius,1787 (Fig. 6)

Papilio regulus Stoll,1790

Papilio brama Guerin-Meneville,1840

Papilio ab.solinus Fruhsotrfer,1902

Papilio nikagoras Fruhstorfer,1909

Papilio tubero Fruhstorfer,1909

Papilio palinurus palinurus; Godfrey,1916

Papilio palinurus palinurus; Pendlebury,1923

Papilio palinurus palinurus; Godfrey,1930

Papilio palinurus palinurus; Godfrey,1932a

Papilio palinurus palinurus; Pinratana,1977

Papilio palinurus palinurus; Pinratana,1992

สถานที่พบ : เพชรบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เพชรบุรี นครศรีธรรมราช สงขลา กาญจนบุรี ปัตตานี ตรัง สตูล ยะลา

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เมียนมาร์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย

1.5 *Papilio paris paris* Linnaeus,1758 (Fig. 7)

Papilio paris f.decorosa Fruhstorfer,1909

Papilio majestatis Fruhstorfer,1909

Papilio paris f.vern.splendorifer Fruhstorfer,1909

Papilio angelicae Bryk,1939

Papilio reductoomaculata Bryk,1939

Papilio sumbingensis Toxopeus,1937

Papilio paris paris; Godfrey,1916

Papilio paris paris; Godfrey,1927

Papilio paris paris; Godfrey,1930

Papilio paris paris; Godfrey,1932a

Papilio paris; Reeves,1966

Papilio paris paris; Pinratana,1977

Papilio paris paris; Pinratana,1992

Papilio paris paris; Motono & Negishi,1989

Papilio paris paris; Osada, Uemura & Uehara,1999

Papilio paris f.indo-chinensis; Lemee,1950

Papilio paris paris f.vern.splendorifer; Metaye,1957

Papilio paris paris f.aest.paris; Metaye,1957

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ สถานีสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เพชรบุรี ชุมพร นครนายก เชียงใหม่ จันทบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล อินเดีย เมียนมาร์ ลาว เวียตนาม จีน ฮ่องกง

2. Family Pieridae

2.1 *Pareronia anais anais* (Bouge,1837) (Fig. 8)

Danais anais Bouge,1837

Nepheronia livilla Fruhstorfer,1902

Pareronia valeria persides Fruhstorfer,1903

Pareronia lutea Eliot,1978

Pareronia valeria hippia; Fruhstorfer,1910

Pareronia valeria hippia; Godfrey,1916

Pareronia valeria hippia; Godfrey,1927

Pareronia valeria hippia; Godfrey,1930

Pareronia persides livilla; Davidson & Macbeth,1938

Pareronia persides; Lemee,1950

Pareronia valeria persides; Metaye,1957

Pareronia valeria persides f.livilla; Metaye,1957

Pareronia valeria lutescens; Reeves,1966

Pareronia anais; Pinratana,1983

Pareronia anais anais; Motono & Negishi,1989

Pareronia anais anais; Osada, Uemura & Uehara,1999

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : แม่ฮ่องสอน ลำปาง เชียงใหม่ สุโขทัย นนทบุรี กรุงเทพมหานคร สระบุรี ลพบุรี ฉะเชิงเทรา นครนายก ชลบุรี เลย สกลนคร ชัยภูมิ นครราชสีมา ราชบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี อุทัยธานี นครศรีธรรมราช ระนอง ตรัง สตูล

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย เมียนมาร์ ลาว เวียตนาม จีน มาเลเซีย

3. Family Nymphalidae

3.1 Subfamily Nymphalinae

3.1.1 *Cethosia biblis perakana* Fruhstorfer,1902 (Fig. 9)

Papilio biblis Drury,1773

สถานที่พบ : เขื่อนจุฬาภรณ์ อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : แม่ฮ่องสอน ลำปาง เชียงใหม่ สุโขทัย นนทบุรี กรุงเทพมหานคร สระบุรี ลพบุรี ฉะเชิงเทรา นครนายก ชลบุรี เลย สกลนคร ชัยภูมิ นครราชสีมา ราชบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี อุทัยธานี นครศรีธรรมราช ระนอง ตรัง

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย เมียนมาร์ ลาว เวียตนาม จีน ฮ่องกง มาเลเซีย ฟิลิปปินส์

3.1.2 *Bassarona recta monilis* Moore,1897 (Fig. 10)

Symphaedra recta de Nicéville, 1886

Euthalia recta monilis Fruhstorfer,1913

Euthalia recta monilis Pinratana,1979

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย :

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย เมียนมาร์ มาเลเซีย

3.1.3 *Kallima inachus siamensis* Fruhstorfer,1912 (Fig. 11)

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงใหม่ แพร่ ลพบุรี สระบุรี นครราชสีมา ชลบุรี

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย จีน เมียนมาร์ มาเลเซีย

3.2 Subfamily Morphinae

3.2.1 *Thauria aliris pseudaliris* (Butler,1877) (Fig. 12)

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : ลพบุรี นครศรีธรรมราช

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย จีน เมียนมาร์ มาเลเซีย

3.2.2 *Stichophthalma louisa siamensis* Rothschild,1916 (Fig. 13)

สถานที่พบ : อ.เมืองปาน จ.ลำปาง อ.ป๋ัว จ.น่าน

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : น่าน แพร่ ลำปาง

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย จีน เมียนมาร์ เวียตนาม

4. Family Lycaenidae

4.1 Subfamily Lycaeninae

4.1.1 *Surendra quercetorum quercetorum* (Moore,1858) (Fig. 14)

Amblypodia quercetorum Moore,1858

Surendra vivarna amiseka; Reeves, 19XX

Surendra quercetorum quercetorum; Pinratana,1981

Surendra quercetorum quercetorum; Seki,1986

Surendra quercetorum quercetorum; Motono & Negishi,1989

สถานที่พบ: เขื่อนจุฬาภรณ์ อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : แพร่ เชียงใหม่ ราชบุรี กาญจนบุรี กรุงเทพมหานคร นครนายก นครราชสีมา เลย ระนอง กระบี่ พังงา

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย เมียนมาร์ ลาว

5. Family Brahmaeidae

5.1 Subfamily Brahmaeinae

5.1.1 *Brahmaea wallichii wallichii* Gray, 1831 (Fig. 15)

Brahmaea conchifera Butler, 1880

Bombya spectabilis Hope,

Brahmaea rufescens Butler, 1880

สถานที่พบ: เขื่อนจุฬาภรณ์ อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จ.พิษณุโลก

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : ชัยภูมิ พิษณุโลก

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล อินเดีย เมียนมาร์

6. Family Saturniidae

6.1 *Actias maenas* Doubleday, 1847 (Fig. 17-18)

Actias maenas Doubleday, 1847

Argema maenas; Allen, 1981

Actias maenas; Nassig & Peigler, 1984

Actias maenas; Lampe, 1985

สถานที่พบ : ภาคกลาง

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงราย เชียงใหม่ น่าน สระบุรี นครนายก กาญจนบุรี ระยอง จันทบุรี

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล อินเดีย จีน เมียนมาร์ ลาว กัมพูชา เวียตนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย

7. Family Uraniidae

7.1 Subfamily Uraniinae

7.1.1 *Lyssa zampa* (Butler,1869) (Fig. 16)

Nyctalemon zampa Butler, 1869

Nyctalemon crameri Boisduval, 1874

Nyctalemon najabula Moore, 1877

Nyctalemon docile Butler, 1877

Nyctalemon dilutus Röber, 1927

Lyssa zampa; Holloway, 1976

สถานที่พบ : อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงใหม่ อุทัยธานี กรุงเทพมหานคร นครราชสีมา นครศรีธรรมราช

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล อินเดีย จีน เมียนมาร์ ลาว กัมพูชา เวียตนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย

8. Family Nolidae

8.1 Subfamily Chloephorinae

8.1.1 *Gabala polyspilalis* Walker, 1866 (Fig. 19)

สถานที่พบ : อุทยานแห่งชาติห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : อุทัยธานี

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล อินเดีย

9. Family Sphingidae

9.1 *Clanis titan* Rothschild & Jordan 1903 (Fig. 20)

Ambulyx phalaris Hampson, 1892

Clanis gigantea Rothschild, 1894

Clanis titan tinan ; Seitz, 1928

สถานที่พบ : อุทยานแห่งชาติห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : อุทัยธานี

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ :

9.2 *Eupanaca perfecta perfecta* (Butler, 1875) (Fig. 21)

Panaca perfecta Butler, 1875

Chaerocampa metallica Hampson, 1892

สถานที่พบ : อุทยานแห่งชาติห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงใหม่

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย ภูฐาน เมียนมาร์ เวียตนาม

9.3 *Amplypterus mansoni* (Clark, 1924) (Fig. 22)

Compsogene mansoni Clark, 1924

สถานที่พบ : เขื่อนจุฬาภรณ์ อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : เนปาล อินเดีย ไต้หวัน เวียตนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย

กลุ่มด้วง Order Coleoptera

1. Family Lucanidae

1.1 *Prosopocoilus (Cyclotropus) inquinatus nigripes* (Boileau, 1905) (Fig. 23)

Metopodontus nigripes Boileau, 1905

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Vanroon, 1910

Metopodontus biplagiatus subsp. *nigripes*; Gravely, 1915

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Didier & Seguy, 1953

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Bomans, 1967

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Bomans, 1968

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Bomans, 1970

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Delisle, 1975

Metopodontus biplagiatus var. *nigripes*; Bomans, 1991

Prosopocoilus (Cyclotropus) biplagiatus ssp. *nigripes*; Maes, 1992

Prosopocoilus biplagiatus; Ikeda, 1993

Prosopocoilus biplagiatus; Mizunuma & Nagai, 1994

Prosopocoilus (Cyclotropus) biplagiatus ssp. *biplagiatus*; Maes, 1992

สถานที่พบ : เขื่อนจุฬาภรณ์ อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงใหม่ ลำปาง แพร่ พิจิตร นครสวรรค์ ชัยภูมิ นครราชสีมา อุบลราชธานี ลพบุรี นครนายก กรุงเทพมหานคร สระบุรี กาญจนบุรี จันทบุรี ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : บังคลาเทศ เมียนมาร์ จีน ลาว กัมพูชา เวียตนาม มาเลเซีย

2. Family Scarabaeidae

2.1 *Cheirotonus parryi* Gray,1848 (Fig. 24)

Propomacrus parryi Deyr, 1874

สถานที่พบ : เขาสอยดาว อ.โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงใหม่ ชัยภูมิ นครราชสีมา จันทบุรี

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย จีน เมียนมาร์

3. Family Carabidae

3.1 *Mouhotia batesi* Lewis, 1879 (Fig. 25)

สถานที่พบ : สถานีสิ่งแวดล้อมสะแกราช อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : เชียงใหม่ แพร่ ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย เมียนมาร์ ลาว

กลุ่มจักจั่น Order Homoptera

1. Family Cicadidae

1.1 *Tosena fasciata* (Fabricius, 1787) (Fig. 26)

Tettigonia fasciata Fabricius, 1787

Cicada fasciata; Olivier, 1791

Cicada fasciata; Germar, 1830

Cicada fasciata; Silbermann, 1834

Cicada fasciata; Blanchard, 1840

Tosena fasciata; Amyot & Serville, 1843

Tosena fasciata; Walker, 1850

Tosena fasciata; Distant, 1889

Tosena fasciata; Kirkaldy, 1907

Tosena fasciata; Moulton, 1910

Cicada melanoptera White, 1864

Tosena melonoptera; Atkinson, 1884

Tosena melonoptera; Distant, 1888

Tosena melonoptera; Ashton, 1914

Tosena melonoptera; Distant, 1917

Tosena melonoptera; Paiva, 1919

Tosena albata; Distant, 1878

Tosena albata; Waterhouse, 1884

Tosena albata; Atkinson, 1884

สถานที่พบ : เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูเขียว อ.คอนสาร จ.ชัยภูมิ

เขตการแพร่กระจายในประเทศไทย : ลำปาง

เขตการแพร่กระจายต่างประเทศ : อินเดีย เมียนมาร์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย

Figs. 1 ***Troides helena cerberus*** **(Felder & Felder)** ♂

Figs. 2 ***Troides helena cerberus*** **(Felder & Felder)** ♀

Figs. 3 ***Troides aeacus aeacus*** **(Felder & Felder)** ♂

Figs. 4 ***Troides aeacus aeacus*** **(Felder & Felder)** ♀

Figs. 5 ***Papilio protenor euprotenor*** **(Fruhstorfer)**

Figs. 6 ***Papilio palinurus palinurus*** **Fabricius**

Figs. 7 ***Papilio paris paris*** **Linnaeus**

Figs. 8 ***Pareronia anais anais*** **(Bouge)**

Figs. 9 ***Cethosia biblis perakana*** **Fruhstorfer**

Figs. 10 ***Bassarona recta monilis*** **Moore**

Figs. 11 ***Kallima inachus siamensis*** **Fruhstorfer**

Figs. 12 ***Thauria aliris pseudaliris*** **(Butler)**

Figs. 13 ***Stichophthalma louisa siamensis*** **Rothschild**

Figs. 14 ***Surendra quercetorum quercetorum*** **(Moore)**

Figs. 15 ***Brahmaea wallichii wallichii*** **Gray**

Figs. 16 ***Lyssa zampa*** **(Butler)**

Figs. 17 ***Actias maenas*** **Doubleday ♀**

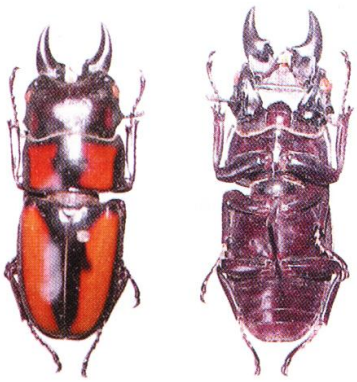
Figs. 18 ***Actias maenas*** **Doubleday ♂**

Figs. 19 ***Gabala polyspilalis*** **Walker**

Figs. 20 ***Clanis titan*** **Rothschild & Jordan**

Figs. 21 ***Eupanaca perfecta perfecta*** **(Butler)**

Figs. 22 ***Amplypterus mansoni*** **(Clark)**



Figs. 23 ***Prosopocoilus (Cyclotropus) biplagistus nigripes*** **(Boileau)** ♂

Figs. 24 ***Cheirotonus parryi*** **Gray** ♂

Figs. 25 ***Mouhotia batesi*** **Lewis**

Figs. 26 ***Tosena fasciata*** **(Fabricius)**

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจพบแมลงที่หาและใกล้สูญพันธุ์จำนวน 23 ชนิด แบ่งเป็นผีเสื้อจำนวน 9 วงศ์ รวม 19 ชนิด คือ 1.วงศ์ Papilionidae ได้แก่ *Troides aeacus aeacus* (Felder & Felder), *Troides helena cerberus* (Felder & Felder), *Papilio palinurus palinurus* Fabricius, *Papilio protenor euprotenor* (Fruhstorfer) และ *Papilio paris paris* Linnaeus 2.วงศ์ Pieridae ได้แก่ *Pareronia anais anais* (Bouge) 3.วงศ์ Nymphalidae ได้แก่ *Bassarona recta monilis* Moore, *Kallima inachus siamensis* Fruhstorfer, *Cethosia bibilis perakana* Fruhtorfer, *Thauria aliris pseudaliris* (Butler) และ *Stichophthalma louisa siamensis* Rothschild 4.วงศ์ Lycaenidae ได้แก่ *Surendra quercetorum quercetorum* (Moore) 5.วงศ์ Brahmaeidae ได้แก่ *Brahmaea wallichii wallichii* Gray 6.วงศ์ Saturniidae ได้แก่ *Actias maenas* Doubleday 7.วงศ์ Uraniidae ได้แก่ *Lyssa zampa* (Butler) 8.วงศ์ Nolidae ได้แก่ *Gabala polyspilalis* Walker 9.วงศ์ Sphingidae ได้แก่ *Clanis titan* Rohschild & Jordan, *Eupanaca perfecta perfecta* (Butler) และ *Amplypterus mansoni* (Clerk) ด้วงจำนวน 3 วงศ์ รวม 3 ชนิด คือ 1.วงศ์ Lucanidae ได้แก่ *Prosopocoilus (Cyclotropus) inquinatus nigripes* (Boileau) 2.วงศ์ Scarabaeidae ได้แก่ *Cheirotonus parryi* Gray 3.วงศ์ Carabidae ได้แก่ *Mouhotia batesi* Lewis และจักจั่นจำนวน 1 วงศ์ รวม 1 ชนิด ได้แก่ *Tosena fasciata* (Fabricius) โดยจากการสำรวจพบเพียงตัวเต็มวัยของแมลงเหล่านี้ ซึ่งในการอนุรักษ์แมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ ควรมีการศึกษาเรื่องพืชอาหารและระบบนิเวศที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของแมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ไปด้วย ซึ่งยังขาดข้อมูลด้านนี้อยู่มากจึงจะสามารถอนุรักษ์แมลงที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ได้ ให้คงอยู่ในธรรมชาติอย่างยั่งยืนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

องุ่น ลิ่ววานิช, 2540. การอนุรักษ์แมลงในประเทศไทย. ว. กีฏ. สัตว. 19(2):95-99.

Arrow, G.J. 1917. Coleoptera. Lamellicornia part II Rutelinae, Desmonycinae, and Euchirinae). *The Fauna of British India including Ceylon and Burma.* London: Taylor & Francis.

Arrow, G.J. 1949. Coleoptera. Lamellicornia, Lucanidae and Passalidae, Vol. IV. *The Fauna of British India including Pakistan, Ceylon, Burma and Malaya.* London: Taylor & Francis.

Barlow, H.S. 1982. *An Introduction to the Moths of South East Asia.* Kuala Lumpur: the author.

Bell, T.R.D. & Scott, F.B. 1937. Sphingidae. Moths vol. 5. *The Fauna of British India including Ceylon and Burma.* London: Taylor & Francis.

Godfrey, E.J. 1916. The butterflies of Siam. Jour. Nat. Hist. Soc. Siam. 2(2):106-147.

Godfrey, 1927. A list of butterflies collected in northern Siam by Mr. M.B. Tennent. Jour. Siam Soc. Nat. Hist. Suppl. 7(2):119-127.

Godfrey, E.J. 1928. Note on a migration of butterflies at Pak Jong, E. Siam. Jour. Siam Soc. Nat. Hist. Suppl. 7(3):189-190.

Godfrey, E.J. 1930. Revised list of the butterflies of Siam, with notes on their geographical distribution. Jour. Siam Soc. Nat. Hist. Suppl. 7(4):203-397.

Godfrey, E.J. 1931. On a collection of butterflies from Kaw Tao. Jour. Siam Soc. Nat. Hist. Suppl. 8(3):191-196.

Hampson, G.F. (1892). Moths vol. 1. *The Fauna of British India including Ceylon and Burma.* London: Taylor & Francis.

Inoue, H., Kennet, R.D. and Kitching, I.J. 1997. Moths of Thailand, Vol.2. Sphingidae. Chok Chai Press, Bangkok.

Lekagul, B., Askin, K., Nabhitabhata, J., and Samruadkit, A. 1997. Field guide to the butterflies of Thailand, Bangkok.

Pinratana, A. 1981. Butterflies in Thailand. Vol.4. Lycaenidae. Viratham Press. Bangkok.

Pinratana, A. 1983. Butterflies in Thailand. Vol. 2. Pieridae and Amathusiidae. Viratham Press. Bangkok.

Pinratana, A. 1985. Butterflies in Thailand. Vol.5. Hesperiidae. Viratham Press. Bangkok.

Pinratana, A. 1988. Butterflies in Thailand. Vol.6. Satyridae Libytheidae and Riodinidae. Viratham Press. Bangkok.

Pinratana, A. and Eliot, J.N. 1992. Butterflies in Thailand. Vol. 7 Papilionidae and Danaidae. (3rd revised edition). Bosco offset. Bangkok.

Pinratana, A. and Eliot, J.N. 1996. Butterflies in Thailand. Vol. 3 Nymphalidae (2nd revised edition). Bosco Offset. Bangkok.

Pinratna, A. and J-M. Maes. 1999. Lucanidae of Thailand. St. Gabrial Thailand. 103 pp.

Pinratna, A. and Lampe, R.E.S. 1990. Moths of Thailand. Vol.1 Saturniidae. Bosco Offset. Bangkok.

อนุกรมวิธานของไรบนผลผลิตทางการเกษตร

Taxonomic Study on Mites Associated with Stored Products

วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน
เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม รายได้ของประเทศส่วนใหญ่มาจากการส่งออกสินค้าเกษตร การปนเปื้อนของศัตรูพืช และสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตลอดจนเชื้อรา และแบคทีเรียในอาหาร พืช และผลผลิตทางการเกษตร กลายเป็นปัญหาสำคัญที่ผู้ส่งออก และหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ต้อง ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะอาจถูกหยิบยกขึ้นมาใช้เป็นประเด็นในการกีดกันทางการค้าได้สำ หรับประเทศที่เป็นสมาชิกองค์การการค้าโลก (WTO) เนื่องจากปัจจุบันผลลผิตทางการเกษตรหลายชนิดยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับไรศัตรูภายหลังการเก็บเกี่ยวจึงได้ออกทำการสำรวจและเก็ บรวบรวมตัวอย่างไรบนผลผลิตทางการเกษตร อันได้แก่ผลผลิตและผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น เมล็ดธัญพืช แป้ง ผลไม้อบ และตากแห้ง พริกแห้ง ถั่วต่าง ๆ งา เห็ดแห้ง หอม กระเทียม เมล็ดทานตะวัน และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น กุ้งแห้ง ปลาแห้ง ปลากรอบ ปลารมควัน หอย ปลาหมึกแห้ง ฯลฯ และอาหารสัตว์ จากบ้านเรือน ร้านค้า และโกดังเก็บในท้องที่รวม 33 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เพื่อนำตัวอย่างไร กลับมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและตรวจจำแนกชนิด

ผลการศึกษาพบไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตรรวม 4 วงศ์ จำนวน 10 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นไรในวงศ์ Acaridae รวม 7 ชนิดคือ *Lardoglyphus konoi* (Sasa and Asanuma), *Tyrophagus putrescentiae*(Schrank), *Sancassania berlesei* (Michael), *Sancassania* sp. , *Suidasia pontifica* Oudemans, *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze and Robin) และ *Aleuroglyphus* sp. , วงศ์ Glycyphagidae 1 ชนิดคือ *Austroglycyphagus geniculatus* (Vitzhum), วงศ์ Histiostomatidae 1 ชนิดคือ *Histiostoma* sp. และ Eriopyidae 1 ชนิด คือ *Aceria tulipae*(Keifer)

L. konoi เป็นไรศัตรูที่สำคัญที่สุดของผลผลิตในโรงเก็บที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จำพวกอาหารทะเล และ *T. putrescentiae* เป็นไรศัตรูในโรงเก็บทำลายผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากพืชมากที่สุด

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 4406014001

คำนำ

ไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตร

ปัจจุบันในภาวะที่เศรษฐกิจของประเทศ ต้องพึ่งพารายได้จากการส่งออกสินค้าเกษตร การปนเปื้อนของศัตรูพืชและสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตลอดจนเชื้อราและแบคทีเรีย ในอาหารพืช และผลผลิตทางการเกษตร กลายเป็นปัญหาสำคัญที่ผู้ส่งออกและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องต้องให้ความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะประเทศผู้นำเข้าสินค้าดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้ออ้างในการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ และเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ประเทศคู่ค้าต้องการให้ประเทศไทย แสดงรายชื่อศัตรูพืชและผลผลิตทางการเกษตรที่พบในประเทศไทยเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest Risk Analysis) ก่อนที่จะพิจารณาสั่งซื้อ และในขณะเดียวกั นการที่ประเทศไทยจะออกกฎระเบียบในการควบคุมการนำเข้าสินค้าเกษตรให้ปลอดจากสัตรูพืช ก็มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาศัตรูพืชที่มีอยู่แล้วในประเทศไทยด้วย การทราบชนิดของศัตรูพืชและผลิตผลเกษตรที่ถูกต้อง ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ ที่เป็นปัจจุบัน นอกจากจะช่วยให้สามารถสืบค้นข้อมูลที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับศัตรูพืชที่อาจติดมากับพืชและผลิตผลเกษตร นั้น ๆ แล้ว ยังช่วยให้สามารถกำหนดแนวทางในการป้องกันกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย

ผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดทั้งจากพืชและสัตว์ ขณะเก็บรักษาไว้ในบ้านเรือนเพื่อรอการบริโภคหรือในโกดังเก็บเพื่อรอการจำหน่าย ก็ดีอาจได้รับความเสียหายอันเนื่องมาจากการทำลายของไรซึ่งเป็นศัตรูของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวได้โดยเฉพาะเมื่อสภาพแวดล้อมในที่ ๆ เก็บรักษาผลผลิต ดังกล่าวมีความเหมาะสมไรศัตรูที่พบในผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว หรือไรศัตรูในโรงเก็บเหล่านี้ หลายชนิดไม่ได้กินผลผลิตที่เก็บรักษาไว้เป็นหลัก แต่จะกินเชื้อราที่เจริญอยู่บนผลผลิตเหล่านั้น น โดยตรงเช่น *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) และ *Glycyphagus domesticus* (De Geer) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าไรที่พบบนผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวอีกเป็นจำนวนมากเป็นศัตรูทำลายและก่อให้เกิดความเสียหาย แก่ผลผลิตเหล่านั้นโดยตรง เช่นในต่างประเทศพบว่า *Acarus siro* L. และ *Tyrolichus casei* (Oudms.) เป็นศัตรูที่สำคัญและพบบ่อยที่สุดบนผลผลิตหลายชนิดในขณะที่ไรศัตรูในโรงเก็บส่วนใหญ่ จะทำลายผลผลิตเจาะจงเพียงบางชนิด เช่น *Caloglyphus lactis* (L.) มักพบทำลายผลไม้แห้ง และแยม (Evans et al. , 1961), *Lardoglyphus konoi* (Sasa and Asanuma) ชอบทำลายผลิตภัณฑ์จากปลา *Rhizoglyphus* spp. ชอบทำลายผลผลิตจากพืชหัว เช่น หอม กระเทียม

ในต่างประเทศได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัย เกี่ยวกับไรศัตรูในโรงเก็บไว้อย่างกว้างขวาง ผู้ที่มีส่วนสำคัญในการเผยแพร่ให้งานวิจัยด้านไรศัตรูในโรงเก็บเป็นที่รู้จักและได้รับความสนใจมาจนถึงปัจจุบันได้แก่ Zachvatkin (1936,1941) ได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวไรศัตรูผลผลิตในโรงเก็บในประเทศสหภาพโซเวียต ส่วน Hughes (1961) และ Solomon (1946,1960) ก็ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ ไรศัตรูเหล่านี้ไว้ในประเทศอังกฤษ โดยเฉพาะ Hughes ในปี 1976 ได้จำแนกชนิดของไรที่พบบนผลผลิตในโรงเก็บที่ได้จากการสำรวจและเก็บ

รวบรวม บนธัญพืช แป้ง และอาหารสัตว์ จำนวนถึง 54 ชนิด ในผลไม้แห้งและขนมจำนวน 3 ชนิด ในเนื้อแห้ง ปลาแห้ง อาหารปลา กระดูก และเขาสัตว์ จำนวน 4 ชนิด และในเนยแข็ง เนื้อมะพร้าวแห้ง เมล็ดฝ้าย และถั่วลิสงอีก 17 ชนิด

ในอินเดียได้มีผู้ให้ความสนใจศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับไร *Lardoglyphus konoi* (Sasa and Asanuma) ซึ่งเป็นศัตรูที่สำคัญของปลาแห้ง ผลิตภัณฑ์จากปลา และสัตว์น้ำเป็นจำนวนมาก เช่น *Vijayam bika* และ John (1981) พบไร *L. konoi* ทำลายผลิตภัณฑ์จากปลาแห้งชนิดต่าง ๆ ทำให้น้ำหนักปลาลดลง และเกิดการปนเปื้อนของสิ่งขับถ่ายที่เกิดจากไร ทำให้สีของผลิตภัณฑ์จากปลาเปลี่ยนไปไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ไรเหล่านี้จะพบเป็นปริมาณมากในผลผลิตที่มีความชื้นค่อนข้างสูง

Lehtinen และ Oksala (1991) พบว่า *Acarus siro* L. และ *Lepidoglyphus destructor* (Schrank) เป็นไรศัตรูที่พบมากในผลผลิตทางการเกษตรของประเทศฟินแลนด์ และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการแพ้

สำหรับในประเทศไทย จนถึงปัจจุบันมีผู้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไรศัตรูในโรงเก็บไว้น้อยมากและข้อมูลส่วนใหญ่ก็อยู่ในลักษณะกระจัดกระจายไม่มีการศึกษา รวบรวมชนิดของไรเหล่านี้ อย่างจริงจัง วัฒนา และคณะ (2527) ได้ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของไรศัตรูกระเทียมในประเทศไทยพบไรศัตรูกระเทียมรวม 4 ชนิดที่สำคัญคือ *Eriophyes tulipae* Keifer ไรชนิดนี้จะทำลายกระเทียมทั้งในสภาพไ ร่และสภาพเก็บรักษาไว้หลังการเก็บเกี่ยว กระเทียมที่เก็บรักษาไว้เพื่อรอการจำหน่าย หรือรอการบริโภค อาจถูกไรชนิดนี้ทำลายเสียหาย ได้สูงถึง 60.75% Suthasanee *et al.* (1986) ได้จำแนกไรศัตรูกระเทียมที่พบในประเทศไทยไว้จำนวน 5 ชนิด คือ *Aceria tulipae* (Keifer), *Rhizoghyphus* sp. , *Suidasi*a sp. , *Tyrophagus* sp. และ *Caloglyphus* sp.

เบญจวรรณ (2544) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาภายนอก ชีววิทยาและเขตแพร่กระจายของไรศัตรูผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง *Lardoglyphus knonoi* (Sasa and Asanuma) พบว่าไรชนิดนี้สามารถสร้างตัวอ่อนในระยะเกาะอาศัย (hypopi) ขึ้นมาระหว่างช่วงระยะการเจริญเติบโตก่อนที่จะเป็นตัวเต็มวัยได้ ซึ่งตัวอ่อนในระยะนี้จะสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพการณ์ที่ประชากรไรเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณหนาแน่นมากในขณะที่อาหารมีอยู่จำกัด

การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนผลผลิตทางการเกษตร เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ทราบจำนวนชนิด และชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตรที่พบในประเทศไทย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการค้นคว้าหาข้อมูล จากเอกสารทางวิชาการที่มีผู้ทำการวิจัยเกี่ยวกับไรชนิดนั้น ๆ ไว้ทั้งในและต่างประเทศเป็นการลดขั้นตอนและป้องกันไม่ให้ดำเนินการวิจัยซ้ำซ้อน

2. ทราบลักษณะการทำลาย ชนิดของผลผลิตทางการเกษตรที่ถูกทำลาย และเขตแพร่กระจายของไรศัตรูผลผลิตชนิดต่างๆ

ผลการตรวจจำแนกชนิดของไรที่เก็บรวบรวมได้จากผลผลิตในโรงเก็บดังกล่าว นอกจากจะเป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการป้องกันและกำจัดแล้ว ยังเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในการ

จัดทำรายชื่อไรศัตรูผลิตผลเกษตรของประเทศไทย เพื่อประกอบการส่งออกผลผลิตเกษตรดังกล่าวในอนาคตด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร ได้แก่ถุงพลาสติกใสขนาดต่างๆ ขึ้นกับชนิดและขนาดของตัวอย่าง กล่องพลาสติก พู่กันเบอร์ 0 กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาดความจุ 68 ควอทซ์ แว่นขยาย (กำลังขยาย 20X) และกรวยแยกไร (Berlese's Tullgren funnel)

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไรเพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ได้แก่กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) ตะเกียง แอลกอฮอล์ พู่กันเบอร์ 0 ตัดขนที่ปลายบางส่วนออก เข็มเขี่ยปลายแหลมและปลายงอ น้ำยาเมาท์สไลด์ (Hoyer's solution) แผ่นสไลด์ coverslip น้ำยาทาเล็บ ตู้อบเครื่องอุ่นสไลด์ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

3. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดไร : ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ชนิด compound microscope ติดอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida) key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรศัตรูในโรงเก็บ และไรตัวห้ำในวงศ์ต่างๆ

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างไร : ออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น เมล็ดธัญพืช แป้ง เนื้อมะพร้าวแห้ง พริก ถั่วต่างๆ เห็ดแห้ง หอม กระเทียม ผลไม้อบและตากแห้ง ฯลฯ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น กุ้งแห้ง ปลาแห้ง ปลากรอบ หอย ปลาหมึกแห้ง ฯลฯ จากร้านค้าในตลาด โกดัง และโรงเก็บ ทั้งของเอกชนและส่วนราชการในท้องที่จังหวัดต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยนำผลผลิตทางการเกษตรที่กล่าวแล้วใส่ในถุงพลาสติก หรือกล่องพลาสติกใส เพื่อนำกลับมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับผลผลิตทางการเกษตรที่เก็บมาได้ พร้อมทั้งสถานที่ วันที่ที่เก็บ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

2. การเตรียมตัวอย่างไรเพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน แยกตัวอย่างไรออกจากผลผลิตทางการเกษตร โดยใช้ Berlese's Tullgren funnel นำตัวอย่างไรที่แยกได้มาเมาท์ลงบนสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) โดยใช้ Hoyer's solution เป็น mounting medium ปิดทับด้วย coverslip นำขึ้นอังบนตะเกียงแอลกอฮอล์เพื่อให้ระยางและส่วนต่างๆของไรยืดออกเต็มที่ นำตัวอย่างไรบนสไลด์ที่เมาท์แล้วเข้าอบในตู้อุณหภูมิ 40 องศาเซ็ลเซียส นาน 5 – 7 วัน จึงนำออกมาผนึกขอบ พร้อมบันทึกชื่ออาหารหรือผลผลิตทางการเกษตร ที่เก็บตัวอย่างไรได้ สถานที่ วันที่ และชื่อผู้เก็บ ไว้ที่มุมด้านซ้ายของสไลด์

3. การจำแนกชนิดไร : นำตัวอย่างไรบนสไลด์มาตรวจจำแนกชนิดใต้กล้อง compound microscope โดยใช้ key สำหรับจำแนกชนิดของไรศัตรูผลผลิตในโรงเก็บวงศ์ต่างๆ และ key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรตัวห้ำ วาดภาพแสดงลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิด

4. จัดทำ key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรบนผลผลิตทางการเกษตรที่พบในประเทศไทย พร้อมทั้งรวบรวมจัดทำรายชื่อไร ชนิดของผลิตผลทางการเกษตรที่สำรวจพบ และเขตแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546

สถานที่ : จังหวัดในภาคต่างๆ ของประเทศไทย รวม 33 จังหวัด ดังนี้

ปี 2544 : เก็บตัวอย่างในจังหวัด : กรุงเทพฯ อยุธยา อ่างทอง สิงห์บุรี สมุทรสงคราม สมุทรสาคร เพชรบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว จันทบุรี

ปี 2545 : เก็บตัวอย่างในจังหวัด : นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี สมุทรปราการ ระยอง นครราชสีมา อุบลราชธานี ศรีสะเกษ อุดรธานี นครพนม กาฬสินธ์

ปี 2546 : เก็บตัวอย่างไรในจังหวัด : พิจิตร พิษณุโลก ลำปาง สุโขทัย แพร่ น่าน เชียงราย ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนผลผลิตทางการเกษตร จำนวน 25 ชนิด อันได้แก่ ผลผลิตและผลิตภัณฑ์จากพืช คือ หอม กระเทียม เมล็ดทานตะวัน งาขาว เห็ดหอมแห้ง พุทราแห้ง รากหนอนตายหยากตากแห้ง ถั่วลิสงดิบ ลูกมะเดื่อตากแห้ง ตุ้มปทุมมา ปลายข้าว ลูกหมากสุก และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ อาหารกุ้ง อาหารปลา ปลาหมึกแห้ง ปลาเนื้ออ่อนตากแห้ง ปลาสวายตากแห้ง ปลาสร้อยรมควัน กุ้งแห้ง ปลาทูเค็มตากแห้ง ปลาช่อนตากแห้ง ปลาจวดตากแห้ง ปลาริวกิวตากแห้ง และปลาฉิงฉ่าง จากบ้านเรือน ร้านค้า และโกดังเก็บในท้องที่ 33 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตร รวม 4 วงศ์ จำนวน 10 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าเป็นไรในวงศ์ Acaridae รวม 7 ชนิด คือ *Lardoglyphus konoi* (Sasa and Asanuma), *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), *Sancassania berlesei* (Michael), *Sancassania* sp., *Suidasia pontifica* Oudemans, *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze and Robin), *Alueroglyphus* sp., วงศ์ Glycyphagidae จำนวน 1 ชนิด คือ *Austroglycyphagus geniculatus* (Vitzhum), วงศ์ Histiostomatidae 1 ชนิด คือ *Histiostoma* sp. และวงศ์ Eriophyidae 1 ชนิด คือ *Aceria tulipae* (Keifer) นอกจากนี้ยังพบไรตัวห้ำอีกจำนวนอย่างน้อย 3 ชนิด เป็นไรตัวห้ำที่ยังไม่สามารถจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ได้ในวงศ์ Ascidae, Phytoseiidae และ Cheyletidae

ไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตรเหล่านี้ บางชนิดทำลายผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เกิดความเสียหายโดยตรง บางชนิดกินเชื้อราและเป็นพาหะทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้อรา สาเหตุของโรคบนผลผลิตเหล่านั้น เช่น *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) การระบาดของไรมักเกิดขึ้นบนผลผลิตที่มีความชื้นค่อนข้างสูง

Key to species of mites associated with stored products in Thailand

1. Stigmata present and opening either between the bases of the chelicerae or on the anterior shoulders of the propodosoma; tarsal claws, if present, sometimes with tenent hirs; empodium, if proesent, usually claw-like or pad-like and not surrounded by a sucker-like pulvillus; cheliceae usually hook-like or styletiform, rarely strong chelate and dentate; palpus without retrose teeth, but may be with a strong claw and / or thumb-claw complex..... ..... **Suborder Actinedida**

   Body worm like with 2 pairs of legs.....**Family Eriophyidae**

   Dorsal plate with setae point posteriorly.....***Aceria***

   Feather claw with 7 – 8 rays; median line on rear third of dorsal plate; thanosome with 70 – 85 microtubuculate rings.....***Aceria tulipae***

- Stigmata absent; tarsal claw present, without tenent hairs; empodium usually present, often claw-like and sometimes surrounded by sucker-like pulvillus; chelicerae seldom hooked or styletiform, usually strong, chelate and dentate; palpus sometimes with retrose teeth, but never with a thumb-claw complex.....**Suborder Acaridida**.....**(2)**

2. Pedipalps with a flattened distal segment; one digit of the chelicera usually with a serrated edge; ventral surface of idiosoma with four prominent chitinous rings..... .....Faily Histiostomatidae

   Female genital opening is a transverse slit lying between the anterior pair of chitinous rings; posterior chitinous rings are on the same level as coxae IV, or between coxae III and IV; male has no genital sense organs and the pennies is barely protrusible ; on taxsus I, all the setae except d are thickened as spines.....…….....***Histiostoma* sp.**

- Pedipalps without a conspicuosly flattened distal segments; chelicerae chelate; ventral surface of idiosoma without prominent chitinous rings..... .....**(3)**

3. With a dorsal transverse groove dividing the propodosoma from the hysterosoma; claw attached to the end of the tarsus by paired sclerites surrounded by a short, cusion-like pretarsus; if the pretarsus is elongated, then the claw is bifid in the female.....

.....**Family Acaridae**.....**(4)**

- Without a dorsal transverse groove dividing the propodosoma from the hysterosoma; claw attached to the end of the pretarsus and sometimes joined to the end of the tarsus by two thin tendons.....**Family Glycyphagidae**

  On genu I, sigma 1 and sigma 2 are almost the same length; la, ra, and ba on tarsus I arise from the basal half of the segment.....***Austroglycyphagus geniculatus***

4. Dorsal idiosoa patterned.....***Suidasia***

   Female with hi as long as or longer than he and with anal region circular; male with anal suckers.....***Suidasia pontifica***

- Dorsal idiosoma unpatterned …….…… **(5)**

5. External vertical setae ve arising near the anterior angles of the dorsal propodosoal shield at the same level as vi, or slightly posterior.....**(6)**

- Setae ve rudimentary or absent or, when present, arising near the middle of the lateral edge of the propodsomal shield.....**(8)**

6. Female with bifid claws on all the legs; male always hetermorphic with the third leg ending to conspicuous process.....***Lardoglyphus***

   Setae d_4 almost equal in length t o d_3; legs I and II of male with undivided claws.....

   .....***Lardoglyphus konoi***

- Female without bifid claws, homomorphic males usually found, although heteromorphic males also occur**.....(7)**

7. Internal scapular setae sci longer than the external scapular setae sce; chelicerae and legs poorly tanned; setae d_1 and la about equal in length, shorter than d_3 and d_4; five ventral terminal spines at the end of the tarsi, of which the three central ones are thickened.....

   .....***Tyrophagus***

   Supracoxal seta expanded and bearing fairly long pectinations; supporting arms of penis point outwards. Penis curved twice, like a coffee pot spout.....***Tyrophagus putrescentiae***

- Internal scapular setae sci shorter than sce; chelicerae and legs reddish-brown in colour.....

  .....***Aleuroglyphus* sp.**

8. On tarsi I and II, ba is enlarged to form a stout conical spine and is setuated close to omega 1.

   .....***Rhizoglyphus***

   Setae sc i more than twice as long as the supracoxal seta.....***Rhizoglyphus echinopus***

- On tarsi I and II, ba is a slender seta; the posterior edge of the hysterosoma is not produced into a projecting shelf in the male.....***Sancassania*.....(9)**

9. Supracoxal seta conspicuous, gradually expanding towards the base and with distinct pectinate margins; male with seta f on tarsus I conspicuously expanded; sae less than twice as long as d_1 .....***Sancassania* sp.**

- Supracoxal seta only very slightly expanded and almost smooth, sometimes inconspicuous; in the female d_4 are shorter than d_3 and have pectinate ends; in the male pa_2 are 3 to 5 times longer than pa_1.....***Sancasania berlesei***

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการตรวจจำแนกชนิดของไรบนผลผลิตทางการเกษตรจำนวน 25 ชนิดที่เก็บรวบรวมได้จากบ้านเรือน ร้านค้า และโกดังเก็บในท้องที่ 33 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งสิ้น 4 วงศ์ 10 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูผลผลิตในวงศ์ Acaridae 7 ชนิด วงศ์ Glycyphagidae 1 ชนิด Histiostomatidae 1 ชนิด และ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิด ไรศัตรูผลผลิตเหล่านี้ส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Acaridae โดยความเสียหายที่เกิดกับผลผลิต อันเนื่องมาจากไรพบว่านอกจากจะทำให้เกิดการสูญเสีย น้ำหนักของผลผลิตโดยตรงแล้ว ยังทำให้เกิดความเสียหาย ในด้านคุณภาพของผลผลิต อันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของไร และสิ่งขับถ่าย ตลอดจนการแพร่กระจายของเชื้อรา และแบคทีเรียต่างๆ อันมีไรเหล่านี้เป็นพาหะด้วย ไรศัตรูผลผลิตเหล่านี้มักแพร่ระบาดในสภาพโรงเรือน หรือที่เก็บที่มีความชื้นค่อนข้างสูง จึงควรหลีกเลี่ยง การเก็บผลผลิตในสภาพดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

เบญจวรรณ ศิริเวชวิวัฒน์. 2544. สัณฐานวิทยาภายนอก ชีววิทยาและเขตแพร่กระจายของไรศัตรูผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง *Lardoglyphus konoi* (Sasa and Asanuma). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัฒนา จารณศรี, ฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์, มานิตา คงชื่นสิน, ชะเล็ก เสรีพันธ์พานิช, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และนวลศรี วงษ์ศิริ. 2527. อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไรกระเทียมในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 98 – 107.

Evans, G.O., J. G. Sheals and D. Macfarlane. 1961. The Terrestrial Acari of the British Isles. An Introduction to their Morphology, Biology and Classi fication. Alden and Mowbray Ltd. Oxford. 219 pp.

Hughes, A.M. 1961. The Mites of Stored Food. Ministry Agri., Fish. And Food (London). Tech. Bull. 9. 287 pp.

Hughes, A.M. 1976. The Mites of Stored Food and Houses. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Technical Bulletin no. 9. (Second edition) (Her Majesty's Stationery Office), London. 400 pp.

Lehtinen, P.T. and I. Oksala. 1991. Astigmatic and Prostigmatic mites of grain stores, mills and Sawmills in Finland, pp.519 – 520, *In*. R. Schuster and P.W. Murphy (eds.). The Acari Reproduction, Development and Life-history Strategics. Chapman and Hall, London.

Solomon, M.E. 1946. Tyroglyphid mites in stored products. Ecological Studies. Ann. Appl. Biol. 33 : 82 – 97.

Solomon, M. E. 1960. Interaction of a predator and physical factors in the control of a grain mite. Proc. 11 th. Intern. Congr. Entomol. 1960. I : 768 – 772.

Suthasanee, B., C. Lekprayoon and W. Meckvichai. 1980. Insects and mites found on stored Garlic in Thailand. Natural History Bulletin of the Siam Society. Vol. 34(2):105 – 113.

Vijayambika, V. And P.A. John. 1981. Seasonal fluctuation in adult population of *Lardoglyphus kenoi* (Acari : Acaridae), pp. 136 – 141. *In* G.P. Channabassavanna (ed.). Contributions To Acarology in India. Anubhava Printers, Bangalore.

Zachvatkin, A.A. 1936. A short key to the Granary Mites. 2nd. ed. (In Russia) Abst. In Rev. Appl. Entomol. A 36:95.

Zachvatkin, A.A. 1941. Fauna of the U.S.S.R. Arachnoidea. VI, no.1. Tyroglyphoidea Acari. [Trans by A. Ratcliffe and A.M. Hughes. 1959. A.I.B.S. (Washington, D.C.) 573p.]

ตารางที่ 1. รายชื่อไรศัตรูผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทย
(รวบรวมระหว่างตุลาคม 2543 – กันยายน 2546)

วงศ์ / ชนิด	ผลผลิตที่พบไร	เขตแพร่กระจาย
Family Acaridae		
-*Lardoglyphus konoi* (Sasa and Asanuma)	-ปลาหมึกแห้ง ปลาเนื้ออ่อนแห้ง ปลาสวายแห้ง ปลาสร้อยรมควัน ปลากดแห้ง ปลาทูเค็ม ปลาฉิงฉ่าง กุ้งแห้ง ปลาไส้ตัน ปลาเกร็ดขาว อาหารกุ้ง	-สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา กรุงเทพฯ อ่างทอง นครสวรรค์ ลำปาง พิจิตร แพร่ เชียงราย ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พังงา ขอนแก่น นครพนม
-*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank)	-หอมแดง หอมแขก กระเทียม ถั่วลิสงดิบ ลูกมะเดื่ออบแห้ง รากหนอนตายหยากตากแห้ง ตุ้มปทุมมา ปลาช่อนแห้ง ปลาจวดแห้ง พุทราตาก-แห้ง กุ้งแห้ง อาหารปลา	-กรุงเทพฯ อยุธยา สิงห์บุรี นครปฐม สระแก้ว จันทบุรี ลำปาง พิษณุโลก น่าน นครสวรรค์ สุโขทัย เชียงราย กาฬสินธ์ ศรีสะเกษ ชัยภูมิ นครพนม ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี กระบี่
-*Sancassania berlesei* (Michael)	-หอมแดง หอมแขก กระเทียม	-จันทบุรี แพร่ ชัยภูมิ อุดรธานี ศรีสะเกษ นครพนม สุโขทัย พังงา
-*Sancassania* sp.	-หอมแขก เห็ดหอม รากหนอนตาย หยากตากแห้ง	-นครสวรรค์ สระแก้ว กรุงเทพฯ
-*Suidasia pontifica* Oudemans	-อาหารสัตว์ เมล็ดทานตะวัน ปลาแห้ง เห็ดหอมแห้ง ถั่วลิสงดิบ ปลาเล็กปลาน้อย อาหารเสริมสำหรับ-สัตว์ งาขาว	-กรุงเทพฯ นครปฐม นครพนม ศรีสะเกษ เพชรบุรี ชุมพร
-*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze and Robin)	-หอมแดง กระเทียม	-กรุงเทพฯ ฉะเชิงเทรา ประจวบคีรีขันธ์
-*Aleuroglyphus* ps.	-รากหนอนตายหยากตากแห้ง	-สระแก้ว
Family Glycyphagidae		
-*Austroglycyphagus geniculatus* (Vitzhum)	-รากหนอนตายหยากตากแห้ง	-สระแก้ว
Family Histiostomatidae		
-*Histiostoma* sp.	-หอมแดง หอมแขก	-นครสวรรค์ ชุมพร ศรีสะเกษ
Family Eriophyidae		
-*Aceria tulipae* (Keijer)	-กระเทียม	-กรุงเทพฯ นครสวรรค์ พิษณุโลก สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช นครพนม เชียงใหม่ ลำพูน

การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนพืชสมุนไพร

Taxonomic Study on Mites Associated with Medicinal Plants

วัฒนา จารณศรี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ออกทำการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนพืชสมุนไพรที่ปลูกในบริเวณที่อยู่อาศัย สวนสมุนไพรเพื่อการศึกษา และเพื่ออุตสาหกรรม การทำยาในท้องที่จังหวัดต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 27 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยนำใบ ดอก ผล หัว และส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติอันเนื่องมาจากการทำลายของไร กลับมาสำรวจหาตัวอย่างไรสาเหตุในห้องปฏิบัติการ จำแนกชนิดของไรศัตรูพืชสมุนไพรที่เก็บได้ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะการทำลาย พืชอาศัยและเขตแพร่กระจายของไรศัตรูพืชเหล่านั้นโดยดำเนินการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรตั้งแต่ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546 บนพืชสมุนไพรจำนวน 53 ชนิด

ผลการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน พบไรศัตรูพืชสมุนไพรรวม 4 วงศ์ จำนวน 33 ชนิด คือวงศ์ Tenuipalpidae พบไรศัตรูพืชสมุนไพรรวม 2 สกุล 4 ชนิด วงศ์ Tetranychidae พบไรศัตรูพืชสมุนไพรรวม 5 สกุล 20 ชนิดวงศ์ Tarsonemidae พบไรศัตรูพืชสมุนไพรรวม 1 สกุล 1 ชนิด และวงศ์ Eriophyidae พบไรศัตรูพืชสมุนไพรรวม 8 สกุล 8 ชนิด นอกจากนี้ยังพบไรตัวห้ำอยู่ร่วมกับไรศัตรูพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ อีกรวม 5 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 17 ชนิด คือ วงศ์ Phytoseiidae พบไรตัวห้ำรวม 3 สกุล 13 ชนิด ที่เหลืออีกจำนวนอย่างน้อย 4 ชนิด เป็นไรตัวห้ำที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ในวงศ์ Stigmaeidae, Bdellidae, Cunaxidae และ Ascidae

---

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06 014 002

คำนำ

ปัจจุบันหน่วยงานภาครัฐและเอกชน ได้หันกลับมาศึกษาและพัฒนาการแพทย์แผนไทย และสมุนไพรกันมากขึ้น โดยได้กำหนดนโยบายในการพัฒนาพืชสมุนไพรขึ้นในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ตั้งแต่ปี 2524 มีการริเริ่มโครงการปลูกสวนสมุนไพรเพื่อการศึกษาของหน่วยงานต่าง ๆ เกิดขึ้นหลายแห่ง และยังมีการปลูกพืชสมุนไพร เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมยาแผนโบราณและแผนปัจจุบัน (คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2539)

จากการสำรวจพืชสมุนไพรที่ปลูกอยู่ในบริเวณที่อยู่อาศัยและสวนสมุนไพรเพื่อการศึกษาในท้องที่จังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย พบว่าไรเป็นศัตรูสำคัญของพืชสมุนไพรหลายชนิด และเนื่องจากเป็นศัตรูพืชที่มีขนาดเล็ก บางชนิดไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า บางครั้งจึงมีผู้เข้าใจผิดว่าลักษณะความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับพืชสมุนไพร อันเนื่องมาจากการทำลายของไรนั้นเป็นลักษณะอาการของโรค ซึ่งเป็นผลทำให้การป้องกันกำจัดไม่ได้ผล และมีความยุ่งยากซับซ้อนมากขึ้น จากการตรวจเอกสาร พบว่า การศึกษาอนุกรมวิธานของไรในประเทศไทย ไม่ว่าจะดำเนินการโดยนักอนุกรมวิธานในประเทศ หรือผู้เชี่ยวชาญด้านอนุกรมวิธานไรจากต่างประเทศก็ตาม ส่วนใหญ่จะเป็นการสำรวจและศึกษาชนิดของไรในวงศ์หนึ่งวงศ์ใดโดยเฉพาะหรือไรศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด เช่น Ehara และ Wongsiri (1975) ได้ทำการสำรวจและตรวจจำแนกชนิดของไรในวงศ์ Tetranychidae บนพืชต่าง ๆ ในประเทศไทยได้รายงานการพบไรในวงศ์นี้รวม 26 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นไรแมงมุมชนิดใหม่ (new species) ถึง 9 ชนิด เช่นเดียวกับ Baker ในปี 1975 ได้เข้ามาทำการสำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างไรศัตรูพืชในประเทศไทยเป็นเวลาประมาณ 3 เดือน ผลการศึกษาพบไรในวงศ์ Tetranychidae รวม 34 ชนิด วงศ์ Tenuipalpidae จำนวน 14 ชนิด และวงศ์ Tuckerellidae อีกจำนวน 3
ชนิด หลังจากนั้น Charanasri *et al.* (1977) ก็ได้ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของไรบนพืชเศรษฐกิจบางชนิดในประเทศไทย พบไรศัตรูพืชและไรตัวห้ำบนพืชเศรษฐกิจ รวม 36 ชนิด

อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่พบเอกสารที่รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับไรศัตรูพืชสมุนไพรโดยเฉพาะของประเทศไทยปรากฏในที่ใดมาก่อน ดังนั้นการศึกษาอนุกรมวิธาน เพื่อให้ทราบชนิดของไรศัตรูพืชสมุนไพร ลักษณะการทำลายที่เกิดจากไรชนิดต่าง ๆ ตลอดจนพืชอาศัย เขตแพร่กระจาย และไรตัวห้ำที่พบอยู่ร่วมกับไรศัตรูพืชสมุนไพรเหล่านั้น จึงนับเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญ ที่จะนำไปสู่การค้นคว้าหาข้อมูลจากเอกสารทางวิชาการ และดำเนินการวิจัยเพื่อหาแนวทางในการป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชสมุนไพรได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์

1.1 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไร ได้แก่ กล่องพลาสติกใสขนาดกว้าง x ยาว x สูง = 24 x 17 x 8.5 ซม. กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาดความจุ 68 ควอทซ์ กล้องถ่ายภาพแว่นขยาย กระดาษบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับตัวอย่างไรที่เก็บได้ แผ่นทำน้ำแข็ง (ice pack)

1.2 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน และตรวจจำแนกชนิดของไร ได้แก่ แผ่น slide, coverslip, เข็มเขี่ยปลายแหลม น้ำยาเมาท์สไลด์ (Hoyer's solution) ตะเกียงแอลกอฮอล์ กล้อง stereo microscope ตู้อบ slide น้ำยาทาเล็บ พู่กันเบอร์ 0 ตัดขนที่ปลายบางส่วนออก

1.3 อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของไร ได้แก่ กล้อง compound microscope key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรศัตรูพืชและไรตัวห้ำ, ในวงศ์ต่าง ๆ เช่น วงศ์ Tetranychidae, Tenuipalpidae, Tarsonemidae, Phytoseiidae, Stigmaeidae และ Cunaxidae

2. วิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างไร : ออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนพืชสมุนไพรที่ปลูกอยู่ในท้องที่จังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยเก็บ ใบ ดอก ผล หัว และส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติ เนื่องจากการทำลายของไรใส่ในกล่องพลาสติก พร้อมบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะการทำลายพืชอาศัย สถานที่ วันที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่างไร นำกล่องตัวอย่างไร แช่ในกล่องพลาสติกรักษาความเย็น ขณะนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ

2.2 การเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน : นำตัวอย่างไรที่เก็บได้จากพืชสมุนไพร เมาท์บนสไลด์ โดยใช้ Hoyer's solution เป็น mounting medium ปิดทับด้วย coverslip นำขึ้นอังบนตะเกียง เพื่อให้ระยางและส่วนต่าง ๆ ของไรยืดออกเต็มที่ นำตัวอย่างไรบนสไลด์ที่ mount แล้ว อบในตู้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 5 – 7 วัน จึงนำออกมาผนึกขอบด้วยยาทาเล็บ พร้อมบันทึกชื่อพืช สถานที่ วันที่ และชื่อผู้เก็บไว้ที่มุมด้านซ้ายของสไลด์

2.3 การจำแนกชนิดของไร : นำตัวอย่างไรบนสไลด์มาตรวจจำแนกชนิด โดยใช้ key สำหรับจำแนกชนิดของไรศัตรูพืช และไรตัวห้ำในวงศ์ต่าง ๆ ใส่ชื่อวงศ์ และชนิดของไรทางด้านขวามือของ สไลด์

2.4 รวบรวมและจัดทำรายชื่อไรบนพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ พร้อมทั้งรายชื่อพืชอาศัย และเขตแพร่กระจาย

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546

สถานที่ 1. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม

2. สวนสมุนไพรในบริเวณที่อยู่อาศัย สวนสมุนไพรเพื่อการศึกษาของหน่วยราชการต่าง ๆ และของเกษตรกร ในพื้นที่ 27 จังหวัดของประเทศไทย ได้แก่

ภาคกลาง : กรุงเทพฯ นนทบุรี นครปฐม สมุทรปราการ สมุทรสาคร

ภาคตะวันออก : ฉะเชิงเทรา ระยอง สระแก้ว จันทบุรี

ภาคใต้ : ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่

ภาคตะวันตก : เพชรบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : นครราชสีมา ชัยภูมิ อุบลราชธานี ศรีสะเกษ

ภาคเหนือ : นครสวรรค์ พิจิตร สุโขทัย แพร่ น่าน ลำพูน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการตรวจจำแนกชนิดของไร ที่เก็บรวบรวมได้จากพืชสมุนไพร จำนวน 54 ชนิด ที่ปลูกอยู่ในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ รวม 27 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบไรศัตรูพืชสมุนไพร รวมทั้งสิ้น 33 ชนิด (ตารางที่ 1) ในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูพืชสมุนไพร ที่อยู่ในวงศ์ Tenuipalpidae รวม 2 สกุล 4 ชนิด วงศ์ Tetranychidae รวม 5 สกุล 20 ชนิด วงศ์ Tarsonemidae จำนวน 1 สกุล 1 ชนิด และวงศ์ Eriophyidae รวม 8 สกุล จำนวน 8 ชนิด นอกจากนี้ยังพบไรตัวห้ำอยู่ร่วมกับไรศัตรูพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ อีกจำนวนอย่างน้อย 17 ชนิด (ตารางที่ 2) ในจำนวนนี้ เป็นไรตัวห้ำในวงศ์ Phytoseiidae รวม 3 สกุล จำนวน 13 ชนิด ที่เหลืออีกจำนวนอย่างน้อย 4 ชนิด เป็นไรตัวห้ำที่ยังไม่สามารถจำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ได้ ในวงศ์ Stigmaeidae, Bdellidae, Cunaxidae และ Ascidae

ไรศัตรูสำคัญที่มักจะพบระบาดบนพืชสมุนไพรหลายชนิด ได้แก่ *Eutetranychus africanus* (Tucker) และ *Tetranychus piercei* McGregor ส่วนไรศัตรูที่พบระบาดรุนแรง แต่บนพืชสมุนไพรเพียงบางชนิดได้แก่ *Tetranychus macfarlanei* Baker and Pritchard พบระบาดรุนแรงบนใบระบาด ผักบุ้ง กระเจี๊ยบเขียว *Eotetranychus* sp. พบระบาดรุนแรงบนใบโยทะกา *Tenuipalpus* sp. พบระบาดรุนแรงบนใบสีเสียดส้มป่อย สำหรับไรตัวห้ำนั้น ชนิดที่พบปะปนอยู่ในประชากรของไรศัตรูพืชสมุนไพรหลายชนิด และพบเป็นปริมาณค่อนข้างสูง ได้แก่ *Amblyseius longispinosus* (Evans) และ *A. nicholsi* Ehara and Lee ซึ่งไรตัวห้ำเหล่านี้ น่าจะได้มีการศึกษาวิจัย เพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์และพัฒนาบทบาท เพื่อการควบคุมไรศัตรูพืชในโอกาสต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานของไรที่เก็บรวบรวมได้จากพืชสมุนไพร จำนวน 54 ชนิด ในพื้นที่ปลูก 27 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบไรบนพืชสมุนไพร รวม 50 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูพืชสมุนไพร รวม 33 ชนิด ที่เหลืออีกจำนวนอย่างน้อย 17 ชนิด เป็นไรตัวห้ำ ไรศัตรูสำคัญที่พบระบาดบนพืชสมุนไพรหลายชนิดได้แก่ *Eutetranychus africanus* (Tucker) และ *Tetranychus piercei* McGregor ส่วนไรตัวห้ำชนิดที่สำคัญมักพบปะปนอยู่ในประชากรของไรศัตรูสมุนไพรหลายชนิด และในปริมาณที่สูงกว่าไรตัวห้ำอื่น ๆ คือ *Amblyseius longispinosus* (Evans) และ *Amblysius nicholsi* Ehara and Lee ซึ่งไรตัวห้ำเหล่านี้น่าจะได้มีการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการอนุรักษ์และพัฒนาบทบาท เพื่อการควบคุมไรศัตรูพืชสมุนไพรในโอกาสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2539. สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ. บริษัทอมรินทร์ พริ้นติ้ง แอนด์ พับบลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ. 257 หน้า
- Baker, E. W. 1975. Plant feeding mites of Thailand (Tetranychidae, Tenuipalpidae and Tuckerellidae). Plant Protection Service Technical Bulletin. No.35. Department of Agricultur, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok. UNDP/FAO THA 68/526. 43 pp.
- Charanasri, V., Bhandhufalck, A. and C. Saringkaphaibul. 1977. Mites associated with economic crops of Thailand. Thai J. Agr. Sci. 10(2) : 81 – 89.

Ehara, S. and T. Wongsiri. 1975. The spider mites of Thailand. Mushi. Vol. 48(13) : 149 – 185.

ตารางที่ 1 รายชื่อไรศัตรูพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทย(รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	พืชอาศัย	เขตแพร่กระจาย
Family Tenuipalpidae		
- *Brevipalpus californicus* (Banks)	อันชัน ยี่หร่า พญายอ ขลู่ ผักหวานบ้าน	นครปฐม กรุงเทพฯ สระแก้ว จันทบุรี
- *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)	อันชัน พลู ประคำดีควาย ทับทิม กันภัยมหิดล ยูคา ลิปตัส มะเฟือง เปล้าน้อย ว่านธรณีสาร จิงจ้อ พลู	กรุงเทพฯ นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี เพชรบุรี กาญจนบุรี ระยอง จันทบุรี สุโขทัย สุราษฎร์ธานี
- *Tenuipalpus* sp.	สีเสียด ส้มป่อย	กรุงเทพฯ นครปฐม
- *Tenuipalpus* sp.	จิก	กระบี่
Family Tetranychidae		
- *Eotetranychus* sp.	โยทะกา ชงโค	ปราจีนบุรี แพร่
- *Eotetranychus* sp.	ผักหวานบ้าน	กรุงเทพฯ สมุทรปราการ จันทบุรี นครสวรรค์
- *Eutetranychus africanus* (Tucker)	หนุมานนั่งแท่น ฝิ่นต้น โมก สะเดา มะเฟือง มันแกว ว่านน้ำ เปล้าน้อย ชุมเห็ดเทศ คูน มะละกอ ละหุ่ง เสนียด	กรุงเทพฯ นนทบุรี นครปฐม กาญจนบุรี นครสวรรค์ พิจิตร ฉะเชิงเทรา ระยอง นครศรีธรรมราช
- *Schizotetranychus baltazare* Rimando	พญายา	ระยอง
- *Schizotetranychus leguminosus* Ehara	แคบ้าน, โสน, ประดู่, คูน	กรุงเทพฯ สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา
- *Schizotetranychus colocasiae* Ehara	บอน เผือก	ราชบุรี สมุทรปราการ
- *Oligonychus biharensis* (Hirst)	กระถินโยทะกา กันภัยมหิดล เถาวัลย์เปรียง ส้มเสี้ยว ตะลิงปลิง	นครปฐม สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา สระแก้ว จันทบุรี เพชรบุรี กระบี่
- *Oligonychus coffeae* (Nietner)	ทับทิม	สุพรรณบุรี เพชรบุรี

ตารางที่ 1 (ต่อ) รายชื่อไรศัตรูพืชสมุนไพรที่พบในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	พืชอาศัย	เขตแพร่กระจาย
- *Oligonychus punicae* (Hirst)	คนทา	นนทบุรี
- *Oligonychus saccharinus* Baker and Pritchard)	ตะไคร้ ตะไคร้หอม	กรุงเทพฯ นนทบุรี
- *Tetranychus fijiensis* Hirst	หมาก ประคำดีควาย แคบ้าน เหลียง	สมุทรปราการ จันทบุรี ชุมพร
- *Tetranychus kanzawai* Kishida	หนุมานนั่งแท่น มะละกอ เทียนบ้าน ฟ้าทะลายโจร	กรุงเทพฯ นครปฐม กาญจนบุรี ศรีรสะเกษ
- *Tetranychus macfarlanei* Baker and Pritchard	ใบระบาด ผักบุ้ง กระเจี๊ยบ-เขียว โสน	นครปฐม นครสวรรค์ สมุทรปราการ
- *Tetranychus piercei* McGregor	อันชัน เจ็ดพระยาช้างสาร คูน หนอนตายหยาก แคบ้าน	กรุงเทพฯ ราชบุรี จันทบุรี สุโขทัย น่าน สุราษฎร์ธานี
- *Tetranychus truncatus* Ehara	พญายอ ผักบุ้งไทย	นนทบุรี
- *Tetranychus tumidus* Banks	พญายอ ผักบุ้งไทย ผักบุ้งจีน	นนทบุรี สมุทรปราการ
- *Tetranychus neocalidonichus*	เสนียด	กรุงเทพฯ
- *Tetranychus urticae* Koch	ลำโพง	เชียงใหม่
Family Tarsonemidae		
- *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)	งา ชา ลำโพง	อุบลราชธานี
Family Eriophyidae		
- *Aceria tulipae* (Keifer)	กระเทียม	ลำพูน เชียงใหม่
- *Aculops caricae* Keifer	มะละกอ	กรุงเทพฯ
- *Aculus menoni* Chann.	มะรุม	ราชบุรี
- *Calacarus* sp.	น้อยหน่า	สมุทรปราการ
- *Pluchacarus* sp.	ขลู่	เพชรบุรี
- *Tegolophus* sp.	ผักหวานบ้าน	กรุงเทพฯ สมุทรปราการ
- *Eriophyes dioscoridis* Soliman	ขลู่	เพชรบุรี
- *Vimola* sp.	เปล้าน้อย	ระยอง

ตารางที่ 2 รายชื่อไรตัวห้ำที่พบบนพืชสมุนไพรในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	พืชอาศัย	เขตแพร่กระจาย
Family Phytoseiidae		
- *Amblyseius longispinosus* (Evans)	ผักบุ้งไทย หมาก ผักหวานบ้าน ใบระบาด เผือก พญายอ	กรุงเทพฯ สมุทรปราการ นนทบุรี สุพรรณบุรี
- *Amblyseius nicholsi* Ehara and Lee	กระถิน ทับทิม ผักบุ้งไทย มะเฟือง พญายอ ผักหวานบ้าน จิงจ้อ คนทา สีเสียด ประดู่ คูน	กรุงเทพฯ นนทบุรี สมุทรปราการ นครปฐม นครราชสีมา
- *Amblyseius largoensis* (Muma)	ผักหวานบ้าน ทับทิม เสนียด	กรุงเทพฯ สมุทรปราการ สุพรรณบุรี
-*Amblyseius cinctus* Corpuz and Rimando	ผักหวานบ้าน ยี่หร่า	สุราษฎร์ธานี
- *Amblyseius deleoni* Muma and Denmark	ผักหวานบ้าน ประคำดีควาย ยี่หร่า	จันทบุรี เชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี
- *Amblyseius multidentatus* Swirski and shechter	โยทะกา ชะอม	ฉะเชิงเทรา
- *Amblsyieus paraaerialis* Muma	ขลู่ ชงโค	แพร่
- *Amblyseius aizawai* Ehara and Bhandhufalck	สีเสียด	กรุงเทพฯ
- *Amblyseius* sp.	แคบ้าน	สมุทรปราการ
- *Amblyseius phillipsi* McMurtry and Schicha	ลำโพง	เชียงใหม่
- *Phytoseius hawaiiensis* Prasad	ใบระบาด สีเสียด ตะลิงปลิง ชะเอมไทย โสน เปล่าน้อย	นนทบุรี นครปฐม กรุงเทพฯ สมุทรปราการ ระยอง
- *Phytoseius hongkongensis* Swirski and Shechter	ตะลิงปลิง	นครปฐม
- *Typhlodromus* sp.	จิงจ้อ ส้มเสียว	นนทบุรี สระแก้ว

ตารางที่ 2 รายชื่อไรตัวห้ำที่พบบนพืชสมุนไพรในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	พืชอาศัย	เขตแพร่กระจาย
Family Stigmaeidae (Unidentified)	ขลู่	เพชรบุรี
Family Bdellidae (Unidentified)	อันชัน หางไหลแดง ฝิ่น	ฉะเชิงเทรา นครปฐม สุโขทัย
Family Cunaxidae (Unidentified)	ประดับ ขลู่	กระบี่
Family Ascidae (Unidentified)	เจ็ดพระยา ช้างสาร อันชัน	จันทบุรี สุราษฎร์ธานี

การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มเขียวหวาน

Taxonomic Study on Spider Fauna in Tangerine Orchards

วิภาดา วังศิลาบัตร เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์
กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่างและศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มเขียวหวานของเกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ 12 จังหวัด ได้แก่ กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี สระบุรี นครนายก สุพรรณบุรี ปราจีนบุรี เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ ชุมพร สงขลา จันทบุรี น่าน พบแมงมุม 18 วงศ์ 51 สกุล 68 ชนิด แมงมุมที่อาศัยหากินบนต้นส้มพบ 12 วงศ์ 34 สกุล 46 ชนิด ได้แก่ วงศ์ Araneidae พบ 12 ชนิด คือ *Anepsion* sp., *Araneus dayongensis* Yin. et. al., *A. mitificus* (Simon), *Cyclosa confusa* Boes. et. Str., *C. cucurbitoria* (Yin et. al), *Cyrtarachne inaequalis* Thorell, *Eriovixia leglaisei* (Simon), *Gasteracantha hasselti* C.L. Koch, *G. kuhli* (C.L.Koch), *Neoscona jinghongensis* Yin. et. al., *Zygiella calyphtrata* (Workman), *Z. nadleri* Heimer วงศ์ Clubionidae พบ 7 ชนิด คือ *Cheiracanthium adjacensoides* Song, Chen et. Hou *C. fibrosum* Zhang, Hu. et. Zhu, *C. insulanum* (Thorell), *C. unicum* Boes. et. Str, *Clubiona deletrix* O.P. Cambridge, *C. filicata* O.P. Cambridge, *C. violaceovittata* Schenkel. วงศ์ Linyphiidae คือ *Hylyphantes graminicola* (Sundevall). วงศ์ Oecobiidae พบ *Oecobius* sp. วงศ์ Oxyopidae พบ 3 ชนิด คือ *Hamataliwa sanmenensis* Song et Zheng, *Oxyopes javanus* Thorell, *O. lineatipes* (C.L.Koch). วงศ์ Pholcidae พบ *Spermophora senoculata* (Duges). วงศ์ Salticidae พบ 6 ชนิด คือ *Cosmophasis micans* Simon, *Epeus flavobilineatus* (Doleschall), *Myrmarachne plataleoides* (O. P. Cambridge), *Phintella versicolor* (C.L. Koch), *P. vittata* (C.L.Koch), *Telamonia dimidiata* (Simon). วงศ์ Sparassidae พบ *Olios* sp. วงศ์ Tetragnathidae พบ *Leucauge celebesiana* (Walckenaer) วงศ์ Theridiidae พบ 6 ชนิด คือ *Achaearanea jinghongensis* Zhu, *Argyrodes* sp., *Chrysso lingchuanensis* Zhu. et. Zheng., *C. pulcherrima* (Mello-beitao), *Coleosoma blandum*

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06 014 003

O.P. Cambridge, *Theridion chikunii* Yaginuma. วงศ์ Thomisidae พบ 4 ชนิด คือ *Amyciaea lineatipes* Pickard-Cambridge, *Cymbacha* sp., *Oxytate parallela* (Simon), *Thomisus stoliczka* (Thorell). วงศ์ Uloboridae พบ 3 ชนิด คือ *Philoponella* sp, *Ponella* sp, *Uloborus* sp. แมงมุมที่อาศัยหากินบนวัชพืชใต้ต้นส้มพบ 13 วงศ์ 20 สกุล 24 ชนิด ได้แก่ วงศ์ Araneidae พบ 4 ชนิด คือ *Araneus inustus* (L. Koch), *Argiope catenulata* (Dolesschall), *Chorizopes* sp., *Larinia* sp. วงศ์ Clubionidae คือ *Clubiona japonicola* Boes. et. Str. วงศ์ Corinnidae คือ *Castianeira* sp. วงศ์ Gnapohosidae พบ 2 ชนิด คือ *Poecilochroa unifascigera* (Boes. et. Str), *Scotophaeus* sp. วงศ์ Lycosidae พบ 1 ชนิด คือ *Pardosa pseudoannulata* (Boes. et. Str). วงศ์ Oxyopidae พบ 2 ชนิด คือ *Oxyopes javanus* Thorell, O. *lineatipes* (C. L. Koch). วงศ์ Philodromidae พบ *Tibellus* sp. วงศ์ Pisauridae พบ *Dolomedes* sp. วงศ์ Salticidae พบ *Evarcha flavocincta* (C. L. Koch). วงศ์ Sparassidae พบ *Isopoda* sp. วงศ์ Tetragnathidae พบ 5 ชนิด คือ *Dyschiriognatha* sp, *Meta* sp., *Tetragnatha javana* (Thorell), *T. mandibulata* Walckenaer, *T. maxillosa* Thorell. วงศ์ Thomisidae พบ 2 ชนิด คือ *Runcinia acuminata* (Thorell) และ *R. albostriata* Boes. et. Str. วงศ์ Zodariidae พบ 2 ชนิด คือ *Asceua* sp และ *Mallinella* sp.

แมงมุมทั้ง 68 ชนิดที่พบในสวนส้มเขียวหวาน มี 54 ชนิดที่เคยพบในสวนส้มโอและเคยบรรยายลักษณะอนุกรมวิธานไว้แล้ว (วิภาดา, 2543) ส่วนอีก 14 ชนิด ยังไม่เคยพบในพืชเศรษฐกิจใดมาก่อน และพบในสวนส้มเขียวหวานเป็นครั้งแรกดังนี้ วงศ์ Araneidae พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Araneus dayongensis* Yin. et. al, *Araneus mitificus* (Simon), *Cyrtarachne inaequelis* Thorell, *Zygiella calyptrata* (Workman). วงศ์ Clubionidae พบ 6 ชนิด ได้แก่ *Cheiracanthium fibrosum* Zhang, Hu. et. Zhu, *C. insulanum* (Thorell), *C. unicum* Boes. et. Str; *Clubiona deletrix* O.P. Cambridge, *C. filicata* O.P. Cambridge และ *C. violaceovittata* Schenkel. วงศ์ Gnaphosidae พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Scotophaeus* sp. วงศ์ Sparassidae พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Isopoda* sp. วงศ์ Theridiidae พบ 2 ชนิด ได้แก่ *Achaearanea jinghongensis* Zhu และ *Chrysso pulcherrima* (Mello–beitao)

แมงมุมชนิดที่มีประชากรสูงในสวนส้มและเป็นชนิดที่กินแมลงหรือไรศัตรูส้มที่สำคัญได้แก่ *Zygiella calyptrata* (Workman) *Z. nadleri* Heimer ทั้ง 2 ชนิดนี้ชักใยกลมดักกินแมลงที่บินได้มาติดใย เช่น ผีเสื้อ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไก่แจ้ส้ม และเป็นแมงมุมใยกลมที่พบมากที่สุดในสวนส้มเขียวหวาน *Clubiona deletrix* O. P. Cambridge เป็นแมงมุมที่มีนิสัยว่องไวและล่าเหยื่อกินกลางคืน อาหาร ได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ *Hylyphantes graminicola* (Sundevall) หากินกลางวัน จับกินไรแดงส้ม และไรเหลืองส้มเป็นอาหาร เพศเมียกินไรสูงสุด 30 ตัวต่อวัน หรือกินเฉลี่ย 22 ตัวต่อวัน มีประชากรค่อนข้างมากในสวนส้ม *Oxyopes javanus* Thorell และ *O. lineatipes* (C. L. Koch) นิสัยว่องไว อาศัยหากินทั้งบนต้นส้มและวัชพืชใต้ต้นส้ม อาหารหลักคือ แมลงวันผลไม้ เพลี้ยต่าง ๆ *Olios*

sp. อาศัยหากินตามใบส้มโดยการล่าเหยื่อกินช่วงกลางวัน อาหารได้แก่ หนอนผีเสื้อต่าง ๆ เช่น หนอนแก้วส้ม

คำนำ

ส้มเขียวหวานเป็นผลไม้ที่คนไทยนิยมบริโภคทั่วไป ส่วนใหญ่จะผลิตขึ้นเพื่อบริโภคกันภายในประเทศแต่สามารถส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศเช่นกัน ตลาดส่วนใหญ่อยู่ในเอเชีย ปี 2541 มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณการรวม 178,000 ไร่ ผลผลิต 281,000 ตัน ปริมาณการใช้ในประเทศ 280,000 ตัน ปริมาณการส่งออก 454 ตัน มูลค่า 6.26 ล้านบาท (นิรนาม 2543) แมลงศัตรูส้มที่สำคัญแบ่งเป็น 6 อันดับ ได้แก่ Thysanoptera, Homoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera และ Diptera ซึ่งประกอบด้วยแมลงศัตรู 23 ชนิด และความสำคัญของแมลงที่เป็นศัตรูจะแตกต่างกันออกไป แมลง 3 ชนิด ได้แก่ หนอนชอนใบส้ม เพลี้ยไฟพริก และเพลี้ยไก่แจ้ส้มเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญที่สุดของส้มทุกชนิด และพบระบาดเป็นประจำในแหล่งปลูกส้ม (ชลิดา และคณะ 2539) การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูเหล่านี้เกษตรกรใช้สารเคมีเป็นหลัก ลาวัลย์ (2537) รายงานว่า จากการสำรวจการใช้สารเคมีในการปลูกส้มเขียวหวานในจังหวัดปทุมธานีและสระบุรี ซึ่งเป็นแหล่งใหญ่ในการปลูกส้มเขียวหวานของภาคกลาง ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงมีนาคม 2536 โดยเก็บข้อมูลเกี่ยวกับการใช้สารเคมีในการผลิตส้มเขียวหวาน 1 รุ่นในปี 2535/36 หรือที่เรียกว่า ส้มปี พบว่าที่จังหวัดปทุมธานี มีการใช้สารฆ่าแมลง 23 ประเภท ที่ใช้มาก ได้แก่ methomyl มีใช้ถึงร้อยละ 96.1 รองลงมาได้แก่ dimethoate มีใช้ร้อยละ 80.7 เกษตรกรนิยมใช้สารฆ่าแมลงหลายชนิดผสมกันในการฉีดพ่นแต่ละครั้ง กล่าวคือที่ปทุมธานี เกษตรกรใช้ 1 – 8 ชนิด และที่สระบุรีใช้ 1 – 6 ชนิดผสมกันต่อครั้ง การผลิตส้ม 1 รุ่นจำนวนครั้งของการใช้สารฆ่าแมลง 28 ครั้ง ช่วงออกดอกถึงก่อนเก็บผล เป็นช่วงที่มีการใช้สารฆ่าแมลงมากที่สุด คือ มีจำนวนครั้งที่ใช้โดยเฉลี่ย 22 ครั้ง

นักวิจัยหลายประเทศลงความเห็นว่าแมงมุมเป็นตัวห้ำที่สำคัญชนิดหนึ่งของแมลงศัตรูพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ และมีหลายท่านที่รายงานถึงความสำคัญของแมงมุมในสวนส้ม (Riechert & Lockley, 1984) Mansour & Whitecomb (1986) ชี้ให้เห็นว่า แมงมุมมีบทบาทสำคัญในการลดประชากรของแมลงศัตรูส้ม การศึกษาประชากรแมงมุมตลอดปีบนต้นส้ม โดยการใช้ท่อนไม้เคาะกิ่งส้มและบนดินโดยใช้กับดัก (pitfall trap) ในสวนส้มที่ Kibbutz Afeg ทางภาคเหนือของอิสราเอล บนต้นส้มพบแมงมุมถุง *Chiracanthium mildei* L. Koch 52% *Theridion* sp พบ 34% บนดินพบแมงมุมวงศ์ Gnaphosidae 43% และ Lycosidae 35% ส่วนการศึกษาด้านการปราบทางชีวภาพของแมงมุมต่อเพลี้ยหอย *Ceroplastes floridensis* Mask บนต้นส้ม กิ่งส้ม 3 กิ่ง ที่เอาแมงมุมออกและไม่เอาแมงมุมออก จำนวนเพลี้ยหอยเพิ่มจาก 44 เป็น 309 และ 47 เป็น 56 ตามลำดับ กิ่งส้มที่เอาแมงมุมออกจะเป็น

ราดำ แต่กิ่งส้มที่ไม่เอาออกจะไม่เป็นราดำ Muma (1975) ได้สำรวจแมงมุมในสวนส้มในมลรัฐ Florida เป็นเวลา 20 ปี พบแมงมุม 19 วงศ์ 91 ชนิด วงศ์ที่พบชนิดแมงมุมมากได้แก่ Theridiidae และ Araneidae พบวงศ์ละ 18 ชนิด วงศ์ Salticidae และ Dictynidae พบวงศ์ละ 9 ชนิด วงศ์ Linyphiidae พบ 8 ชนิด วงศ์ Lycosidae พบ 6 ชนิด วงศ์ Gnaphosidae พบ 5 ชนิด ส่วนวงศ์อื่น ๆ พบน้อยกว่า 5 ชนิด แมงมุมที่พบปริมาณประชากรมากได้แก่ พวก cribellate spiders ซึ่งอยู่ในวงศ์ Dictynidae Uloboridae และ Dinopidae ในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดศึกษาแมงมุมในสวนส้มเขียวหวานมาก่อน ข้อมูลจากการศึกษาทางอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มเขียวหวาน ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นความรู้พื้นฐานของการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูส้มวิธีผสมผสานต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่างแมงมุม ได้แก่ สวิงจับแมลง ท่อนไม้กลมยาว หลอดแก้วทดลอง ขวดดองตัวอย่างแมงมุม กล่องพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กัน กระดาษซับ พู่กัน ปากคีบ และสารเคมี ได้แก่ alcohol 75% ethyl acetate

2. อุปกรณ์ในการจำแนกชนิดและวาดภาพ ได้แก่ จาน petridish ทรายหยาบ กล้อง stereomicroscope กระดาษกราฟ กระดาษลอกลาย ดินสอ ปากกา rotring เอกสารด้านอนุกรมวิธานแมงมุมที่เกี่ยวข้อง

3. อุปกรณ์ในการถ่ายภาพ ได้แก่ กล้อง stereomicroscope พร้อมกล้องถ่ายภาพฟิล์มสไลด์ ฟิล์มสี

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุม แมงมุมแต่ละชนิดมีอุปนิสัยแตกต่างกัน การเก็บตัวอย่างจึงมีหลายวิธี ดังนี้

1.1. การเคาะ สุ่มต้นส้มเขียวหวานในแต่ละสวนที่จะสำรวจแมงมุม 10 ต้น แต่ละต้นสุ่มกิ่งส้ม 5 กิ่งให้กระจายรอบ ๆ ต้น ใช้ท่อนไม้กลมยาวเคาะกิ่งส้มที่เลือกไว้กิ่งละ 5 ครั้ง แมงมุมจะตกลงในสวิงจับแมลงที่รองใต้กิ่ง ทำการคัดแยกแมงมุมตัวอ่อนและตัวเต็มวัยออกจากกัน จับแมงมุมตัวเต็มวัยใส่กล่องพลาสติกที่วางก้อนสำลีไว้ หยด ethyl acetate 2 – 3 หยดลงบนก้อนสำลีเพื่อทำให้แมงมุมสลบ ดองแมงมุมในขวดที่บรรจุแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเก็บรักษาตัวอย่างต่อไป ส่วนแมงมุมตัวอ่อนจับแยกใส่กล่องพลาสติกใสที่ปูพื้นกล่องด้วยกระดาษซับ กล่องละ 1 ตัว หยดน้ำใส่กระดาษให้ชื้น นำกล่องแมงมุมเหล่านี้ไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จนแมงมุมตัวอ่อนกลายเป็นตัวเต็มวัยเพื่อฆ่าและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมต่อไป

1.2 การมองหา วิธีนี้เหมาะสำหรับจับแมงมุมทุกสถานที่และทำให้ผู้จับสามารถทราบถึงพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิด บันทึกพฤติกรรมต่าง ๆ ของแมงมุมแต่ละชนิด เช่นเวลาที่ออกหากิน บริเวณที่อยู่อาศัยและหากิน วิธีจับเหยื่อและชนิดของเหยื่อ ลักษณะใยดักเหยื่อ เป็นต้น การจับแมงมุมอาจใช้มือจับ หรือใช้หลอดแก้วช่วยในการจับ ส่วนการฆ่าและเก็บรักษาตัวอย่างแมงมุมเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.3 การโฉบ ใช้สวิงจับแมลงโฉบแมงมุมจากวัชพืชในสวนส้มเขียวหวาน ฆ่าและรักษาตัวอย่างแมงมุมดังข้อ 1.1

2. การศึกษาอนุกรมวิธาน

แมงมุมที่เก็บรักษาไว้ นำมาจำแนกเป็นวงศ์ สกุล ชนิด การจำแนกจะศึกษาจากตำราต่าง ๆ โดยเฉพาะจากเอกสารเกี่ยวกับการศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในแถบทวีปเอเชีย วาดรูปโดยใช้ grid scale เพื่อให้ได้ขนาดและสัดส่วนที่แท้จริงตามตัวอย่างแมงมุมที่วาด บรรยายลักษณะทางอนุกรมวิธาน ถ่ายรูปแมงมุม เก็บและรักษาตัวอย่างแมงมุมไว้ในพิพิธภัณฑ์ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

1. **เวลา** เริ่มดำเนินการวิจัยตั้งแต่ ตุลาคม 2543 ถึงกันยายน 2546

2. **สถานที่**

2.1 สำรวจแมงมุมจากสวนส้มเขียวหวานเกษตรกรจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ กรุงเทพมหานคร ปทุมธานี สระบุรี นครนายก สุพรรณบุรี ปราจีนบุรี เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ ชุมพร สงขลา จันทบุรี น่าน

2.2 กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจและศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มเขียวหวานของเกษตรกรใน 12 จังหวัด พบแมงมุม 18 วงศ์ 51 สกุล 68 ชนิด แมงมุมที่พบอาศัยหากินบนต้นส้มพบ 12 วงศ์ 34 สกุล 46 ชนิด ส่วนแมงมุมที่อาศัยหากินบนวัชพืชใต้ต้นส้มพบ 13 วงศ์ 20 สกุล 24 ชนิด ชนิด *Oxyopes javanus* Thorell และ *O. lineatipes* (C. L. Koch) อาศัยหากินทั้งบนต้นส้มและวัชพืชใต้ต้นส้ม (Table 1)

แมงมุมทั้ง 68 ชนิด ที่พบในสวนส้มเขียวหวาน มี 54 ชนิด ที่เคยพบในสวนส้มโอและเคยบรรยายลักษณะอนุกรมวิธานไว้แล้ว (วิภาดา, 2543) ส่วนอีก 14 ชนิด ยังไม่เคยพบในพืชเศรษฐกิจใดมาก่อน และพบในสวนส้มเขียวหวานเป็นครั้งแรกดังนี้ วงศ์ Araneidae พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Araneus dayongensis* Yin. et. al, *Araneus mitificus* (Simon), *Cyrtarachne inaequalis* Thorell, *Zygiella calyptrata* (Workman). วงศ์ Clubionidae พบ 6 ชนิด ได้แก่ *Cheiracanthium fibrosum* Zhang Hu.

et.Zhu, *C. insulanum* (Thorell), *C. unicum* Boes. et. Str., *Clubiona deletrix* O. P Cambridge, *C. filicata* O. P. Cambridge และ *C. violaceovittata* Schenkel. วงศ์ Gnaphosidae พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Scotophaeus* sp. วงศ์ Sparassidae พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Isopoda* sp. วงศ์ Theridiidae พบ 2 ชนิด ได้แก่ *Achaearanea jinghongensis* Zhu และ *Chrysso pulcherrima* (Mello-betao).

Araneus dayongensis Yin. et. al. 1990 (Fig. 1.)

วงศ์ Araneidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศเมีย 4 มิลลิเมตร

หัวและอก สีเหลืองทอง ส่วนหัวแคบ ส่วนอกกว้าง ตา 8 ตาเรียง 2 แถว ตาแถวหน้าขนาดใหญ่กว่าแถวหลัง ระยะห่างของตาแถวหน้าเท่ากัน ระยะห่างของตากลางแถวหน้ามากกว่าระยะห่างตากลางแถวหลัง ตาข้างแถวหน้าและแถวหลังอยู่ติดกัน chelicerae มี boss มีฟันแถวหน้าและหลังแถวละ 4 ซี่ maxillae มีความกว้างเท่ากับความยาว ปลายบานออก มี scopulae labium มีความกว้างมากกว่าความยาว และ reborder sternum มีความกว้างเท่ากับความยาว ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 2, 4, 3

ท้อง สีครีม รูปไข่ มีจุดกลมเรียงตามยาวบนท้อง 5 คู่ spinnerets มี colulus

เขตการแพร่กระจาย จันทบุรี

พฤติกรรม ชักใยกลมแนวเอียงดักกินแมลงที่บินได้มาติดใย เช่น ผีเสื้อ

Araneus mitificus (Simon) 1886 (Fig.2)

วงศ์ Araneidae

ชื่อสามัญ Kidney Garden Spider

ชื่อพ้อง *Epeira mitificus* Simon, 1886

Araneus mitificus Boesenberg & Strand, 1906

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศผู้ 6 มิลลิเมตร

หัวและอก สีเหลือง มีความยาวมากกว่าความกว้าง ตากลางคู่หน้าใหญ่ที่สุด และอยู่ห่างกันมากกว่าตากลางคู่หลัง ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน thoracic groove มีขีดตามยาว chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลังไม่มีฟัน maxillae มีความยาวเท่ากับความกว้างและขนานกัน มี

scopulae labium แบบ reborder มีความกว้างมากกว่าความยาว ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 2, 4, 3 ปลาย coxa ของขาคู่ที่ 1 มีติ่งยาว ส่วนปลาย coxa ของขาคู่อื่นมีติ่งสั้น

ท้อง สีขาว รูปทรงเป็นรูปไข่ มีแถบสีดำเป็นรูปไตพาด ด้านบนท้องค่อนมาทางหน้า และมีแถบสีดำรอบ ๆ ริมท้อง

เขตแพร่กระจาย ปราจีนบุรี

พฤติกรรม ชักใยกลมดักเหยื่อระหว่างกิ่งส้ม แมงมุมซ่อนตัวในใบส้มที่ม้วนใกล้ ๆ ใย

Cyrtarachne inaequalis Thorell, 1895 (Fig.3)

วงศ์ Araneidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศเมีย 11 มิลลิเมตร

หัวและอก สีครีม มีความยาวเกือบเท่ากับความกว้าง ตากลางแถวหน้าและหลังเรียงเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน chelicerae มีฟันแถวหน้า 3 ซี่ แถวหลัง 7 ซี่ maxillae มีความยาวเท่ากับความกว้างและขนานกัน มี scopulae labium มีความกว้างมากกว่าความยาว sternums รูปหัวใจ มีขนประปราย ขามีขนทั่วไป ไม่มีหนาม

ท้อง ผิวท้องมีลักษณะเหมือนหนัง ไม่มีขน มีลวดลายสีน้ำตาลอ่อนสลับสีเข้ม ท้องรูปทรงสามเหลี่ยม ด้านหน้าส่วนท้องยื่นคลุมส่วนหัวและอก ปลายท้องยาวแหลม ด้านบนของ 2 ข้างท้องยกนูนสูงขึ้น

เขตการแพร่กระจาย เพชรบูรณ์

พฤติกรรม พบแมงมุมเกาะดักเหยื่อที่ใยดักเหยื่อ บางครั้งเกาะบริเวณใต้ใบ ถุงไข่สีน้ำตาล รูปทรงยาวแหลมไปทางปลาย แขวนเรียงเป็นแถว แม่แมงมุมเฝ้าไข่ที่ถุงไข่

Zygiella calyptrata (Workman) 1984 (Fig.4)

วงศ์ Araneidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศผู้ 3.5 มิลลิเมตร เพศเมีย 3.5 มิลลิเมตร

หัวและอก ส่วนหัวสีน้ำตาลดำ ส่วนอกสีน้ำตาล เพศผู้สีมืดกว่าเพศเมีย ตากลางคู่หน้าใหญ่ที่สุดและอยู่ห่างกันมากกว่าตากลางคู่หลัง ตาข้างแถวหน้า

และหลังอยู่ติดกัน chelicerae สีน้ำตาลดำ มีฟันแถวหน้า 4 ซี่ แถวหลัง 4 ซี่ และมีฟันซี่เล็ก ๆ ระหว่างฟัน 2 แถวนี้ maxillae ขนานกัน มีความยาวเท่ากับความกว้าง ปลายตัด มี scopulae labium มีความกว้างมากกว่าความยาวและแบบ reborder sternum รูปโล่ห์สีน้ำตาลอ่อน ความยาวขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 2, 4, 3

ท้อง เพศเมียสีขาว ยกเว้นบริเวณขอบสีน้ำตาล มีจุดสีน้ำตาลเล็ก ๆ 2 คู่ บนท้องค่อนไปทางปลายท้อง เพศผู้สีน้ำตาลเข้ม ยกเว้นบริเวณขอบท้องสีขาว ท้องรูปไข่

เขตการแพร่กระจาย ปทุมธานี นครนายก สระบุรี กรุงเทพฯ

พฤติกรรม ชักใยกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 ฟุต ขึงบริเวณใบส้มเขียวหวานใยอยู่ในแนวเอียง กลางวันแมงมุมนอนพักในใบส้มที่พับเข้าหากันใกล้ ๆ ใยดักเหยื่อ บางครั้งพบแม่แมงมุมกำลังเฝ้ากลุ่มไข่ในส้มที่พับ กลุ่มไข่มีใยสีเหลืองหุ้ม แมงมุมเกาะที่ใยเวลาเย็นและกลางคืน คอยดักกินแมลงที่บินได้มาติดใย เช่น ผีเสื้อ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไก่แจ้ส้ม

Cheiracanthium fibrosum Zhang, *Hu et* Zhu 1994 (Fig.5)

วงศ์ Clubionidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศผู้ 5 มิลลิเมตร

หัวและอก สีน้ำตาล มีความยาวมากกว่าความกว้าง ด้านบนนูน ตา 8 ตาขนาดเกือบเท่ากัน ระยะห่างของตากลางแถวหลังมากกว่าระยะห่างตากลางแถวหน้าเล็กน้อย ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน chelicerae ยาว ไม่มีฟัน มี scopulae maxillae 2 อัน ขนานกัน ปลายตัดมี scopulae ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3

ท้อง สีน้ำตาลอ่อน รูปทรงยาว ปลายท้องเรียวแหลม

เขตการแพร่กระจาย จันทบุรี

พฤติกรรม กลางวันพบนอนพักบริเวณใต้ใบส้ม โดยม้วนริมใบเข้ามาปิดตัวไว้และสร้างใยสีขาวปกคลุมตัว หากินกลางคืนโดยการล่าเหยื่อบริเวณใบส้ม อาหารได้แก่เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ

Cheiracanthium insulanum (Thorell), 1878 (Fig.6)

วงศ์	Clubionidae
ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย	เพศผู้ 7 มิลลิเมตร เพศเมีย 7.5 มิลลิเมตร
หัวและอก	สีน้ำตาลเข้ม ตา 8 ตาขนาดเท่ากัน ระยะห่างของตากลางคู่หลังมากกว่าระยะห่างตากลางคู่หน้าเล็กน้อย ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน chelicerae สีน้ำตาลเข้ม มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 1 ซี่ ปลาย maxillae บานออก มี scopulae labium มีความกว้างเท่ากับความยาว ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3
ท้อง	สีเทา
เขตการแพร่กระจาย	ปทุมธานี
พฤติกรรม	กลางวันพบนอนพักบริเวณใต้ใบส้ม โดยม้วนริมใบเข้ามาปิดตัวไว้และสร้างใยสีขาวปกคลุมตัว หากินกลางคืนโดยการล่าเหยื่อบริเวณใบส้ม อาหารได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ

Cheiracanthium unicum Boes. et. Str, 1906 (Fig.7)

วงศ์	Clubionidae
ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย	เพศผู้ 4.3 มิลลิเมตร เพศเมีย 5 มิลลิเมตร
หัวและอก	สีน้ำตาล ตา 8 ตาเท่ากัน ระยะห่างระหว่างตากลางคู่หน้าน้อยกว่าระยะห่างระหว่างตากลางคู่หลัง ตาข้างแถวหน้าและแถวหลังอยู่ติดกัน chelicerae ยาวมีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 3 ซี่ ปลาย maxillae บานออก มี scopulae labium มีความกว้างเท่ากันยาว ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3
ท้อง	สีเทา ลักษณะเหมือนถุง
เขตการแพร่กระจาย	ปทุมธานี
พฤติกรรม	กลางวันพบนอนพักบริเวณใต้ใบส้ม โดยม้วนริมใบเข้ามาปิดตัวไว้และสร้างใยสีขาวปกคลุมตัว หากินกลางคืนโดยการล่าเหยื่อบริเวณใบส้ม อาหารได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ

Clubiona deletrix O.P. Cambridge, 1885 (Fig.8)

วงศ์ Clubionidae

ชื่อพ้อง *Clubiona maculata* Song & Chen, 1979

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศเมีย 9 มิลลิเมตร

หัวและอก สีน้ำตาล มี thoracic groove ตามยาว ตา 8 ตาเรียง 2 แถว และเรียงแบบ recurve ระยะห่างตากลางแถวหน้าน้อยกว่าระยะห่างตากลางแถวหลัง ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 2 ซี่ ปลาย maxillae บานออก กลาง maxillae ผอม มี scopulae labium มีความยาวมากกว่าความกว้างประมาณ 1 เท่า ความยาวขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 2, 3

ท้อง สีเทา รูปทรงคล้ายถุง ยาว

เขตการแพร่กระจาย ปทุมธานี

พฤติกรรม หากินบนใบส้ม กลางวันพบนอนพักบริเวณใบส้มโดยพับริมใบเข้ามาปิดลำตัวไว้ มีใยสีขาวหุ้ม ว่องไวและล่าเหยื่อกินกลางคืน อาหารได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ

Clubiona filicata O.P. Cambridge 1874 (Fig.9)

วงศ์ Clubionidae

ชื่อพ้อง *Clubiona swatowensis* Strand, 1907

Clubiona filicata Gong, 1989

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศผู้ 5.5 มิลลิเมตร เพศเมีย 7 มิลลิเมตร

หัวและอก สีน้ำตาล ตา 8 ตาขนาดเท่ากัน เรียงเป็น 2 แถว ๆ ละ 4 ตา และเรียงแบบ recurve ระยะห่างตากลางแถวหน้าน้อยกว่าระยะห่างตากลางแถวหลัง ตาข้างแถวหน้าและแถวหลังอยู่ติดกัน มี thoracic groove ตามยาว chelicerae มีฟันแถวหน้า 3 ซี่ แถวหลัง 2 ซี่ maxillae ยาว ปลายบานออก มี scopulae labium มีความยาวมากกว่าความกว้าง 1 เท่า ความยาวขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 2, 3

ท้อง สีเทา รูปทรงเหมือนถุง ยาว ด้านบนค่อนมาทางปลายท้องมีจุดสีน้ำตาลเรียงยาว 2 แถว ๆ ละ 6 จุด และมีจุดสีน้ำตาลบนกลางท้อง

เขตการแพร่กระจาย ปทุมธานี

พฤติกรรม หากินกลางคืนโดยการล่าเหยื่อบริเวณใบส้ม กลางวันพบนอนพักบริเวณใบส้มโดยม้วนพับริมใบเข้ามาปิดตัวไว้ มีใยสีขาวหุ้ม อาหารได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ

Clubiona violaceovittata Schenkel, 1936 (Fig.10)

วงศ์ Clubionidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศเมีย 5 มิลลิเมตร

หัวและอก สีน้ำตาล ตา 8 ตาขนาดเท่ากัน เรียงเป็น 2 แถว ๆ ละ 4 ตา และเรียงแบบ recurve ระยะห่างตากลางแถวหน้าน้อยกว่าระยะห่างตากลางแถวหลัง ตาข้างแถวหน้าและแถวหลังอยู่ติดกัน มี thoracic groove ตามยาว chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 2 ซี่ ปลาย maxillae บานออก มี scopulae labium มีความกว้างเท่ากับความยาว ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 2, 3

ท้อง สีเทา รูปทรงยาว ปลายท้องแหลม มีจุดสีน้ำตาลเล็ก ๆ เรียงบริเวณริมท้องด้านบนใกล้ปลายท้อง

เขตการแพร่กระจาย จันทบุรี

พฤติกรรม หากินกลางคืนโดยการล่าเหยื่อบริเวณใบส้ม กลางวันพบนอนพักบริเวณใบส้มโดยม้วนพับริมใบเข้ามาปิดลำตัวไว้ มีใยสีขาวหุ้ม อาหารได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ

Scotophaeus sp (Fig.11)

วงศ์ Gnaphosidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย ตัวอ่อน 4 มิลลิเมตร

หัวและอก สีน้ำตาลดำ ตา 8 ตาอยู่รวมเป็นกลุ่ม เรียง 2 แถว ๆ ละ 4 ตา แถวหน้าเรียงแบบ recurve แถวหลังแบบเส้นตรง thoracic groove ตามยาว ปลาย maxillae เบนเข้าหากันเล็กน้อย labium มีความกว้างเท่ากับความยาว ความยาวขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 2, 3

ท้อง สีน้ำตาลดำ รูปทรงคล้ายถุงยาว

เขตการแพร่กระจาย ปทุมธานี

พฤติกรรม พบนอนพักในใบส้มที่ม้วนเวลากลางวัน มีใยสีขาวหุ้มตัว หากินกลางคืน นิสัยว่องไว

Isopoda sp (Fig.12)

วงศ์ Sparassidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย 11.5 มิลลิเมตร

หัวและอก สีน้ำตาลแบน มีความกว้างเท่ากับความยาว มีขนอ่อนสั้น ๆ ปกคลุมทั่วไป ตา 8 ตาเรียงเป็น 2 แถว และทั้ง 2 แถว recurve เล็กน้อย ตาข้างแถวหลังใหญ่ที่สุดและค่อนข้างนูน chelicerae มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 4 ซี่ ปลาย maxillae เบนเข้าหากัน มี scopulae labium มีความกว้างมากกว่าความยาวเล็กน้อย sternum มีความกว้างเท่ากับความยาว ขาอ้วน ยาวมีขนและหนามทั่วไป

ท้อง สีน้ำตาล มีจุดเรียง 2 แถวบนท้อง 3 คู่ มีขนปกคลุม

เขตการแพร่กระจาย ปทุมธานี

พฤติกรรม ล่าเหยื่อบริเวณพื้นดิน

Achaearanea jinghongensis Zhu 1998 (Fig.13)

วงศ์ Theridiidae

ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย เพศผู้ 2.5 มิลลิเมตร เพศเมีย 3มิลลิเมตร

หัวและอก สีเหลืองทอง นูน ตา 8 ตา เรียงเป็น 2 แถว ตาแถวหน้าเรียงแบบ recurve และแถวหลังแบบ procurve ตากลางแถวหน้าแบบ diurnal eyes ส่วนตาอื่น ๆ แบบ nocturnal eyes ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน ระยะห่างระหว่างตากลางแถวหน้าและตากลางแถวหลังเท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของตากลาง clypeus กว้างกว่าระยะห่างระหว่างตากลางแถวหน้าประมาณ 3.5 เท่า ปลาย maxillae เบนเข้าหากันเล็กน้อย labium กว้างและสั้น sternum ใหญ่กว่า ความยาวของขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 4, 1, 2, 3

ท้อง สีเทา มีจุดสีขาวทั่วไป ส่วนสูงของท้องมากกว่าความยาวท้อง

เขตการแพร่กระจาย ปทุมธานี

พฤติกรรม ชักใยแบบไม่เป็นระเบียบขึงดักเหยื่อระหว่างกิ่งส้ม แมงมุมเกาะกลางใยแบบห้อยหัวลง เพศเมียชักใยกว้างประมาณ 1 ฟุต

Chrysso pulcherrima (Mello-Leitao) 1917 (Fig.14)

วงศ์	Theridiidae
ชื่อพ้อง	*Argyrodes pulcherrimus* Mello-Leitao, 1817
	Chrysso pulcherrima Levi, 1967
ความยาวลำตัวโดยเฉลี่ย	เพศเมีย 3.1 มิลลิเมตร
หัวและอก	สีขาวส่วนหัวนูน ส่วนอกด้านข้างนูน กลางอกเป็นร่องลึกตามยาว ตา 8 ตาเรียงเป็น 2 แถว แถวหน้าเรียงแบบ recurve ตาแถวหลังแบบ procurve ตากลางแถวหน้าแบบ diurnal eyes แถวหลังแบบ nocturnal eyes ตาข้างแถวหน้าและหลังอยู่ติดกัน ระยะห่างของตากลางแถวหน้าและระยะห่างตากลางแถวหลังเท่ากัน ความกว้าง clypeus ประมาณ 3 เท่าของระยะห่างตากลางแถวหน้า ปลาย maxillae โค้งเข้าหากัน labium กว้างมากกว่ายาว sternum รูปหัวใจใหญ่ ความยาวขาต่าง ๆ เรียงจากมากไปหาน้อยดังนี้ 1, 4, 2, 3
ท้อง	สีขาว แบนทางด้านข้างโดยความสูงของท้องมากกว่าความกว้างของท้อง ปลายท้องยื่นแหลม มีหนามยาวบริเวณใกล้ปลายท้อง 2 เส้น
เขตการแพร่กระจาย	ปทุมธานี
พฤติกรรม	ชักใยแบบไม่เป็นระเบียบขึงบริเวณใบส้ม แมงมุมเกาะกลางใยแบบห้อยหัวลง

จากการสำรวจแมงมุมในสวนส้มเขียวหวานของเกษตรกรในช่วงทำงานวิจัย พบว่าชนิดและปริมาณแมงมุมในสวนส้มเขียวหวานต่ำมาก เนื่องจากเกษตรกรใช้สารฆ่าแมลงต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก (ลาวัลย์ 2537) ทำให้ขาดศัตรูธรรมชาติที่ช่วยควบคุมแมลงและไรศัตรูส้ม

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มเขียวหวานของเกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ 12 จังหวัด พบแมงมุม 18 วงศ์ 51 สกุล 68 ชนิด แมงมุมที่อาศัยหากินบนต้นส้มพบ 12 วงศ์ 34 สกุล 46 ชนิด ส่วนแมงมุมที่อาศัยหากินบนวัชพืชใต้ต้นส้ม พบ 13 วงศ์ 20 สกุล 24 ชนิด ชนิด *Oxyopes javanus* Thorell และ *O. lineatipes* (C.L. Koch) อาศัยหากินทั้งบนต้นส้มและวัชพืชใต้ต้นส้ม

แมงมุมทั้ง 68 ชนิดที่พบในสวนส้มเขียวหวาน มี 54 ชนิดที่เคยพบในสวนส้มโอและเคยบรรยายลักษณะอนุกรมวิธานไว้แล้ว (วิภาดา, 2543) ส่วนอีก 14 ชนิด ยังไม่เคยพบในพืชเศรษฐกิจใดมาก่อน และพบในสวนส้มเขียวหวานเป็นครั้งแรกดังนี้ วงศ์ Araneidae พบ 4 ชนิด ได้แก่ *Araneus dayongensis* Yin. et. al, *Araneus mitificus* (Simon), *Cyrtarachne inaequelis* Thorell, *Zygiella calyptrata* (Workman). วงศ์ Clubionidae พบ 6 ชนิด ได้แก่ *Cheiracanthium fibrosum* Zhang, Hu. et. Zhu, *C. insulanum* (Thorell), *C. unicum* Boes. et. Str; *Clubiona deletrix* O.P. Cambridge, *C. filicata* O.P. Cambridge และ *C. violaceovittata* Schenkel. วงศ์ Gnaphosidae พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Scotophaeus* sp. วงศ์ Sparassidae พบ 1 ชนิด ได้แก่ *Isopoda* sp. วงศ์ Theridiidae พบ 2 ชนิด ได้แก่ *Achaearanea jinghongensis* Zhu และ *Chrysso pulcherrima* (Mello–beitao)

แมงมุมชนิดที่มีประชากรสูงในสวนส้มและเป็นชนิดที่กินแมลงหรือไรศัตรูส้มที่สำคัญได้แก่ *Zygiella calyptrata* (Workman), *Z. nadleri* Heimer ทั้ง 2 ชนิดนี้ชักใยกลมดักกินแมลงที่บินได้มาติดใย เช่น ผีเสื้อ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไก่แจ้ส้ม และเป็นแมงมุมใยกลมที่พบมากที่สุดในสวนส้มเขียวหวาน *Clubiona deletrix* O. P. Cambridge เป็นแมงมุมที่มีนิสัยว่องไวและล่าเหยื่อกินกลางคืน อาหารได้แก่ เพลี้ยหอย แมลงวันผลไม้ ผีเสื้อ หนอนผีเสื้อ *Hylyphantes graminicola* (Sundevall) หากินกลางวัน จับกินไรแดงส้ม และไรเหลืองส้มเป็นอาหาร เพศเมียกินไรสูงสุด 30 ตัวต่อวัน หรือกินเฉลี่ย 22 ตัวต่อวัน มีประชากรค่อนข้างมากในสวนส้ม *Oxyopes javanus* Thorell และ *O. lineatipes* (C. L. Koch) นิสัยว่องไว อาศัยหากินทั้งบนต้นส้มและวัชพืชใต้ต้นส้ม อาหารหลักคือ แมลงวันผลไม้ เพลี้ยต่าง ๆ *Olios* sp. อาศัยหากินตามใบส้มโดยการล่าเหยื่อกินช่วงกลางวัน อาหารได้แก่ หนอนผีเสื้อ ต่าง ๆ เช่น หนอนแก้วส้ม

Table 1 A list of spiders observed in tangerine groves

On the trees	On the undergrowth
Family Araneidae	Family Araneidae
Anepsion sp	*Araneus inustus* (L. Koch)
Araneus dayongensis Yin. et. al	*Argiope catenulata* (Doleschall)
Araneus mitificus (Simon)	*Chorizopes* sp
Cyclosa confusa Boes. et. Str.	*Larinia* sp
Cyclosa cucurbitoria (Yin et. al)	Family Clubionidae
Cyrtarachne inaequalis Thorell	*Clubiona japonicola* Boes. et. Str.
Eriovixia leglaisei (Simon)	Family Corinnidae
Gasteracantha hasselti C.L. Koch	*Castianeira* sp
Gasteracantha kuhli (C.L.Koch)	Family Gnaphosidae
Neoscona jinghongensis Yin. et. al.	*Poecilochroa unifascigera* (Boes. et. Str.)
Zygiella calyptrata (Workman)	*Scotophaeus* sp
Zygiella nadleri Heimer	Family Lycosidae
Family Clubionidae	*Pardosa pseudoannulata* (Boes. et. Str)
Cheiracanthium adijacensoides Song, Chen et. Hou	Family Oxyopidae
Cheiracanthium fibrosum Zhang, Hu. et. Zhu	*Oxyopes javanus* Thorell
Cheiracanthium insulanum (Thorell)	*Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch)
Cheirancanthium unicum Boes. et. Str	Family Philodromidae
Clubiona deletrix O.P. Cambridge	*Tibellus* sp.
Clubiona filicata O.P. Cambridge	Family Pisauridae
Clubiona violaceovittata Schenkel	*Dolomedes* sp
Family Linyphiidae	Family Salticidae
Hylyphantes graminocola (Sundevall)	*Evarcha flavocincta* (C.L. Koch)
Family Oecobiidae	Family Sparassidae
Oecobius sp	*Isopoda* sp
Family Oxyopidae	Family Tetragnathidae
	Dyschiriognatha sp
	Meta sp
	Tetragnatha javana (Thorell)

Table 1 (continue)

On the trees	On the undergrowth
Hamataliwa sanmenensis Song et Zheng	*Tetragnatha mandibulata* Walckenaer
Oxyopes javanus Thorell	*Tetragnatha maxillosa* Thorell
Oxyopes lineatipes (C.L. Koch)	Family Thomisidae
Family Pholcidae	*Runcinia acuminata* (Thorell)
Spermophora senoculata (Duges)	*Runcinia albostriata* Boes. et. Str
Family Salticidae	Family Zodariidae
Cosmophasis micans Simon	*Asceua* sp
Epeus flavobilineatus (Doleschall)	*Mallinella* sp
Myrmarachne plataleoides (O.P. Cambridge)	
Phintella versicolor (C.L. Koch)	
Phintella vittata (C.L. Koch)	
Telamonia dimidiata (Simon)	
Family Sparassidae	
Olios sp.	
Family Tetragnathidae	
Leucauge celebesiana (Walckenaer)	
Family Theridiidae	
Achaearanea jinghongensis Zhu	
Argyrodes sp.	
Chrysso lingchuanensis Zhu.et.Zheng	
Chrysso pulcherrima (Mello-beitao)	
Coleosoma blandum O.P.Cambridge	
Theridion chikunii Yaginuma	
Family Thomisidae	
Amyciaea lineatipes Pickard-Cambridge	
Cymbacha sp.	

Table 1 (continue)

On the trees	On the undergrowth
Oxytate parallela (Simon)	
Thomisus stoliczka (Thorell)	
Family Uloboridae	
Philoponella sp	
Ponella sp	
Uloborus sp	

เอกสารอ้างอิง

ชลิดา อุณหวุฒิ เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ มานิตา คงชื่นสิน ฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์ และวัฒนา จารณศรี . 2539. แมลงและไรศัตรูส้มกับการป้องกันกำจัด. หน้า 137 – 160. ใน : รวมกลยุทธ์ส้มเคหะการเกษตร.

นิรนาม. 2543. คู่มือพืชสวนเศรษฐกิจ กองส่งเสริมพืชสวน. กรมส่งเสริมการเกษตร. 314 หน้า.

ลาวัลย์ นิยมวิทย์ . 2537. การใช้สารเคมีในการปลูกส้มเขียวหวาน. ฝ่ายวิชาการสถิติ กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร.

วิภาดา วังศิลาบัตร . 2543. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมในสวนส้มโอ. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2543. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 14 – 152.

Mansour, F and Whitecomb, W. H. 1986. The spiders of a citrus grove in Israel and their role as biological agents of *Ceroplastes floridensis* (Homoptera : Coccidae) Entomophaga. 31(3) : 269 – 276.

Muma, M.H. 1975. Spiders in Florida citrus groves. The Florida Entomologist. 58 (2) : 83 – 90.

Riechert, E.S. and Lockley, T. 1984. Spiders as biological control agents. A. Rev. Ent. 29 : 288 – 320.

Taxonomic Study on Spider Fauna in Tangerine Orchards

Wipada Vungsilabutr Tewin Kulpiyawat

Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research Development Office

---

Abstract

Spider Fauna inhabiting in tangerine orchards were collected from 12 provinces of Thailand during October 2000 – September 2003. The specimens were then identified by comparing some important taxonomic characters like the shape of the male palp, epigyne, eyes position, color and sizes, etc. The studies revealed that there were 18 families, 51 genera, 68 species found in tangerine growing ecocystem. Among them 14 species were recorded for the first time in this country. They were all as follows : *Anepsion* sp., *Araneus dayongensis* Yin. et. al, *A. inustus* (L. Koch), *A. mitificus* (Simon), *Argiope catenulata* (Doleschall), *Chorizopes* sp., *Cyclosa confusa* Boes. et. Str., *C. cucurbitoria* (Yin. et. al), *Cyrtarachne inaequalis* Thorell, *Eriovixia leglaisei* (Simon), *Gasteracantha hasselti* C.L. Koch, *G. kuhli* (C.L.Koch), *Larinia* sp, *Neoscona jinghongensis* Yin. et. al., *Zygiella calyptrata* (Workman), *Z. nadleri* Heimer (Fam. Araneidae). *Cheiracanthium adjacensoides* Song Chen et. Hou, *C. fibrosum* Zhang, Hu et. Zhu., *C. insulanum* (Thorell), *C. unicum* Boes. et. Str, *Clubiona deletrix* O.P. Cambridge, *C. filicata* O.P. Cambridge, *C. japonicola* Boes. et. Str, *C. violaceovittata* Schenkel (Fam. Clubionidae). *Castianeira* sp. (Fam. Corinnidae). *Poecilochroa unifascigera* (Boes. et. Str), *Scotophaeus* sp. (Fam. Gnaphosidae). *Hylyphantes graminicola* (Sundevall) (Fam. Linyphiidae). *Pardosa pseudoannulata* (Boes. et. Str) (Fam. Lycosidae). *Oecobius* sp. (Fam. Oecobiidae). *Hamataliwa sanmenensis* Song et. Zheng, *Oxyopes javanus* Thorell, *O. lineatipes* (C.L. Koch) (Fam. Oxyopidae). *Tibellus* sp. (Fam. Philodromidae). *Dolomedes* sp. (Fam. Pisauridae). *Spermophora senoculata* (Duges) (Fam. Pholcidae). *Cosmophasis micans* Simon, *Epeus flavobilineatus* (Doleschall), *Evarcha flavocincta* (C. L. Koch), *Myrmarachne plataleoides* (O. P. Cambridge), *Phintella versicolor* (C.L. Koch), *P. vittata* (C. L. Koch), *Telamonia dimidiata* (Simon) (Fam. Salticidae). *Isopoda* sp, *Olios* sp. (Fam. Sparassidae). *Dyschiriognatha* sp., *Leucauge celebesiana* (Walckenaer), *Meta* sp., *Tetragnatha javana* (Thorell), *T. mandibulata* Walckenaer, *T. maxillosa* Thorell (Fam.

Tetragnathidae). *Achaearanea jinghongensis* Zhu, *Argyrodes* sp., *Chrysso lingchuanensis* Zhu.et. Zheng, *C. pulcherrima* (Mello-beitao), *Coleosoma blandum* O.P. Cambridge, *Theridion chikunii* Yaginuma. (Fam. Theridiidae). *Amyciaea lineatipes* Pickard-Cambridge, *Cymbacha* sp., *Oxytate parallela* (Simon), *Thomisus stolicka* (Thorell), *Runcinia acuminata* (Thorell), *R. albostriata* Boes. et. Str. (Fam. Thomisidae). *Philoponella* sp., *Ponella* sp., *Uloborus* sp. (Fam. Uloboridae). *Asceua* sp., *Mallinella* sp. (Fam. Zodariidae).

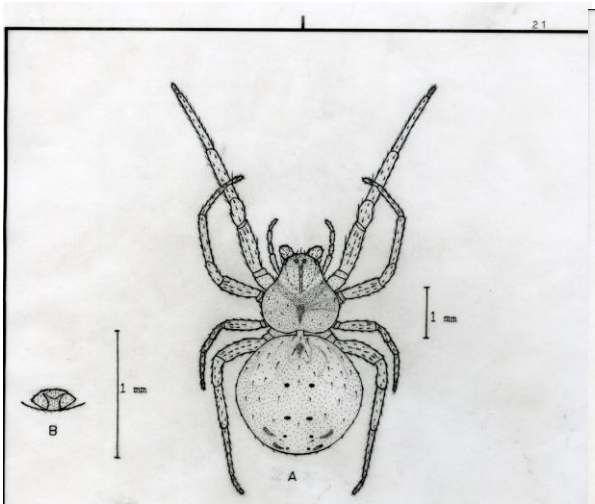


Figure 1 *Araneus dayongensis* Yin. et. al. 1990 (Araneidae) female (A); epigynum (B).

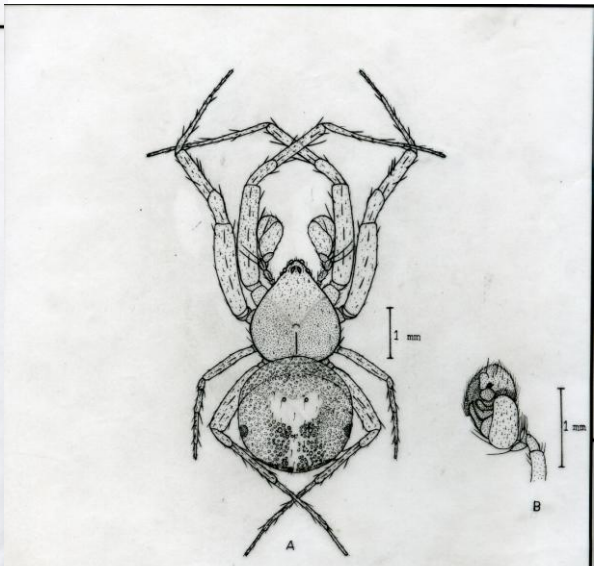


Figure 2 *Araneus mitificus* (Simon) 1886 (Araneidae) male (A), palp (B).

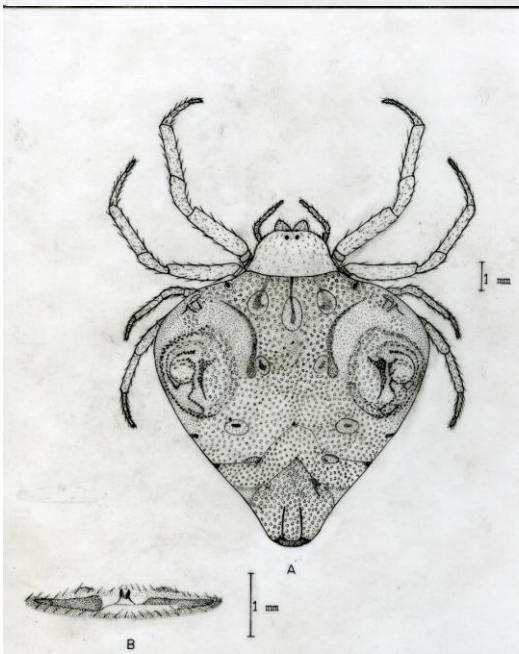


Figure 3 *Cyrtarachne inaequalis* Thorell 1985 (Araneidae) female (A), epigynum (B).

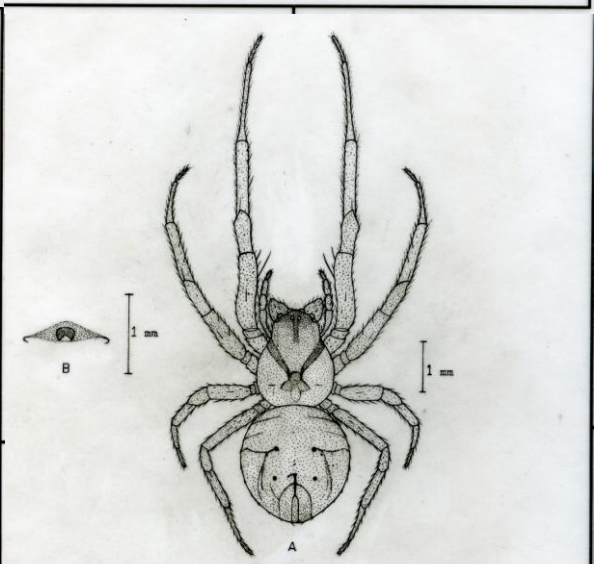


Figure 4 *Zygiella calyptrata* (Workman) 1984 (Araneidae) female (A); epigynum (B).

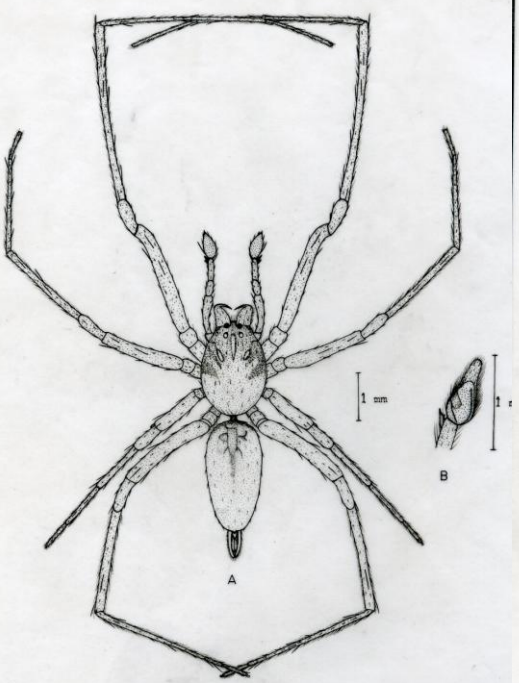


Figure 5 *Cheiracanthium fibrosum* Zhang, Hu et Zhu 1994 (Clubionidae) male (A); palp (B).

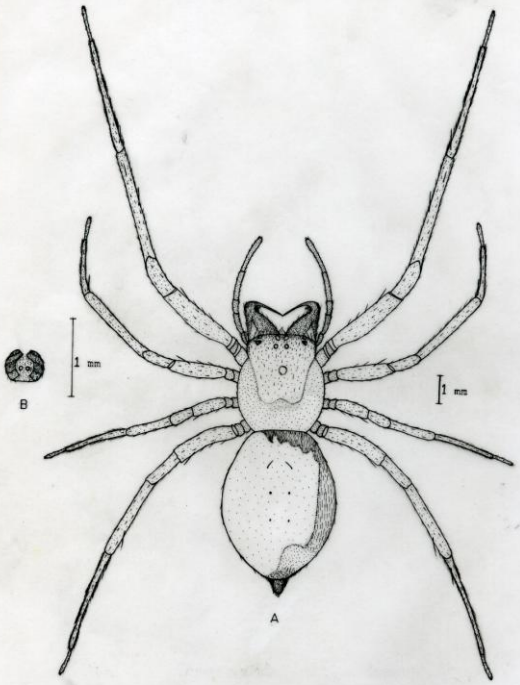


Figure 6 *Cheiracanthium insulanum* (Thorell), 1878 (Clubionidae) female (A); epigynum (B).

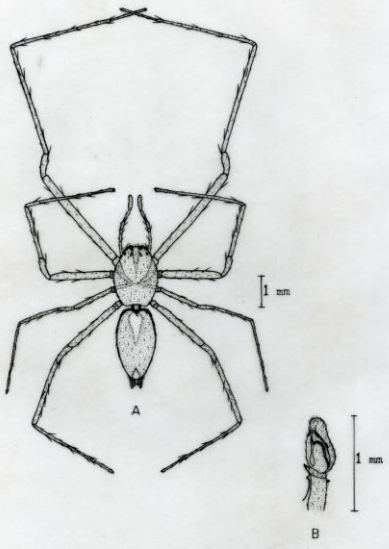


Figure 7 *Cheiracanthium unicum* Boes. et. Str, 1906 (Clubionidae) male (A); palp (B).

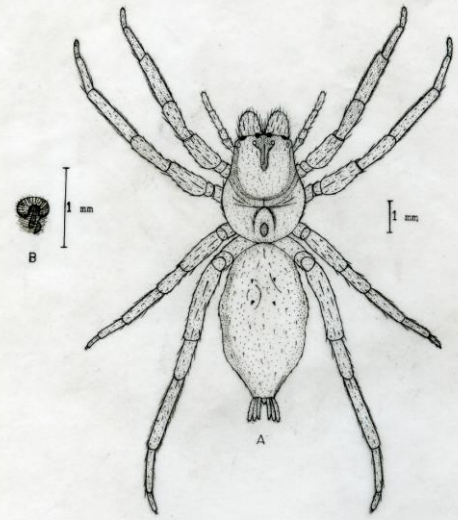


Figure 8 *Clubiona deletrix* O. P. Cambridge, 1885 (Clubionidae) female (A); epigynum (B).

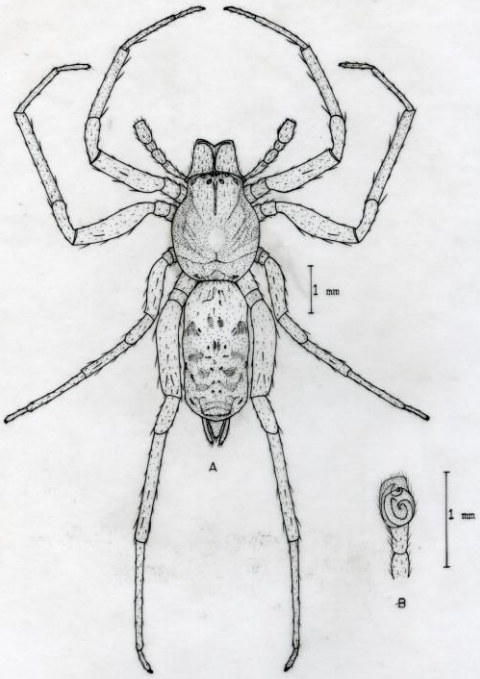


Figure 9 *Clubiona filicata* O.P. Cambridge 1874 (Clubionidae) male (A), palp (B).

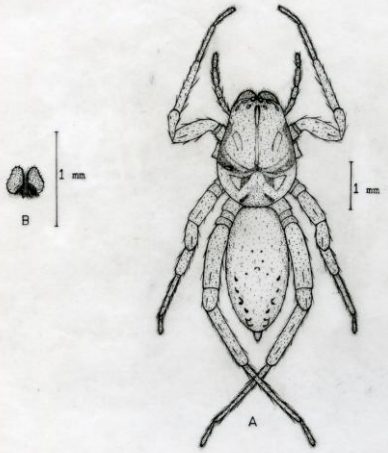


Figure 10 *Clubiona violaceovittata* Schenkel, 1936 (Clubionidae) female (A), epigynum (B).

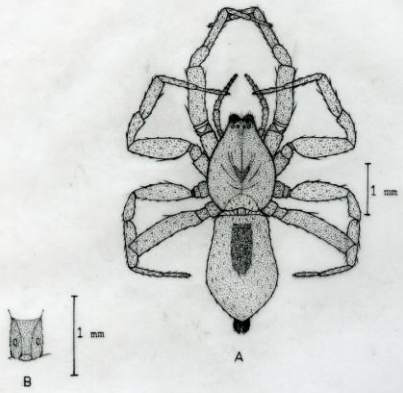


Figure 11 *Scotophaeus* sp. (Gnaphosidae) female (A), epigynum (B).

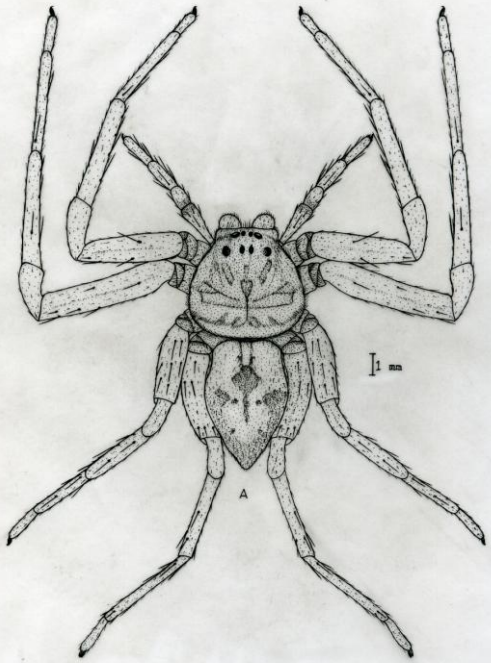


Figure 12 *Isopoda* sp. (Sparassidae). young (A).

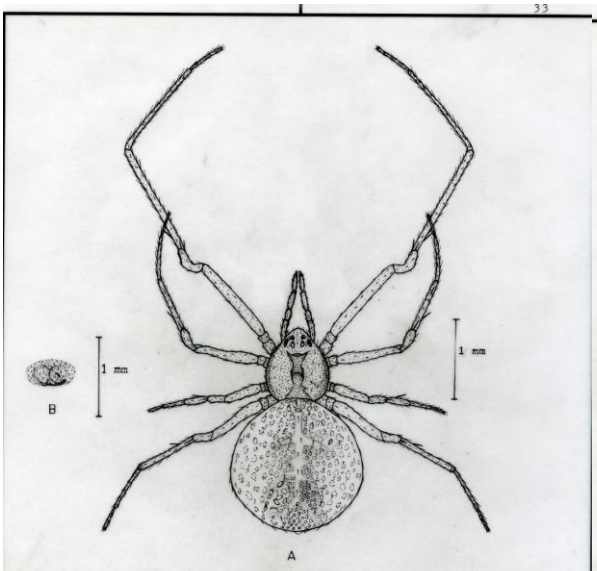


Figure 13 *Achaearanea jinghongensis* Zhu 1998 (Theridiidae) female (A); epigynum (B).

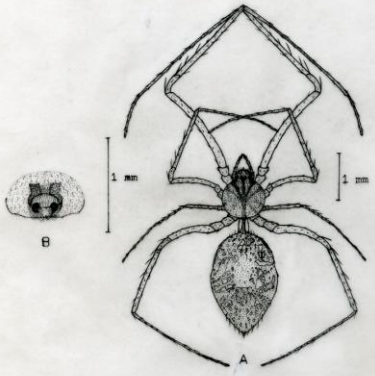


Figure 14 *Chrysso pulcherrima* (Mello-Leitao) 1917 (Theridiidae) female (A); epigynum (B).

การศึกษาชนิด นิเวศวิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุมต่อแมลงวันผลไม้

Study on Species, Ecology and Predation Efficiency of Spider on Fruit Fly

วิภาดา วังศิลาบัตร อัมพร วิโนทัย มนตรี จิรสุรัตน์

กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้ ทำโดยสำรวจและเก็บตัวอย่างแมงมุมในสวนผลไม้เกษตรกรจังหวัดต่าง ๆ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี พิจิตร ชัยนาท สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ชุมพร นครศรีธรรมราช และสงขลา นำแมงมุมแต่ละชนิดใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 10 x 10 x 10 เซนติเมตร กล่องละ 1 ตัว ปูพื้นกล่องด้วยกระดาษซับ และพรมน้ำให้ชื้น ให้แมงมุมอดอาหาร 1 วัน ใส่แมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* (Hendel) กล่องละ 5 ตัวต่อวัน เพื่อทดสอบหาชนิดแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้ จากการทดลองพบว่า แมงมุมส่วนใหญ่ที่ทดสอบกินแมลงวันผลไม้ ได้แก่ วงศ์ Araneidae พบ 7 ชนิด คือ *Argiope catenulata* (Doleschall), *Cyclosa spirifera* Simon, *Cyclosa* sp, *Eriovixia laglaisei* (Simon), *Leucauge fastigata* (Simon), *Zilla* sp, *Cyrtophora unicolor* (Doleschall). วงศ์ Clubionidae พบ 2 ชนิด คือ *Chiracanthium* sp, *Clubiona* sp. วงศ์ Lycosidae พบ 1 ชนิด คือ *Pardosa pseudoannulata* Boes et Str; วงศ์ Oxyopidae พบ 3 ชนิด คือ *Hamataliwa* sp, *Oxyopes javanus* Thorell, *O. lineatipes* (C.L. Koch) วงศ์ Salticidae พบ 8 ชนิด คือ *Epeus flavobilineatus* (Doleschall), *Evarcha flavocincta* (C.L. Koch), *Harmochirus* sp, *Hasarius* sp, *Phintella versicolor* (C.L. Koch), *P. vittata* (C.L. Koch), *Telamonia dimidiata* Simon, *T. festiva* (Thorell); วงศ์ Theridiidae พบ 4 ชนิด คือ *Argyrodes fissifrons* O.P. Cambrige, *Chrysso* sp. A; *Theridion sterninotatum* Boes. et. Str; *Tyrorida ventralis* Thorell

แมงมุมตาหกเหลี่ยมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oxyopes lineatipes* วงศ์ Oxyopidae เพศผู้มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 7.25 มม. เพศเมีย 8.5 มม. หัว อก ขา สีเหลืองทองและเป็นมัน มี 8 ตา โดยตา 6 ตาเรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม ขายาวเรียวแหลมไปทางปลายขาและมีหนามยาวจำนวนมากชี้ขึ้นเกือบตั้งฉากกับขา ท้องเรียว

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06 014 004

แหลมไปทางปลายท้อง แม่แมงมุมวางไข่เป็นกลุ่มบริเวณใบไม้ กิ่งไม้ กลุ่มไข่มีลักษณะกลมแบนมีใยสีขาวหุ้ม กลุ่มไข่หนึ่ง ๆ มีไข่ประมาณ 40 – 110 ฟอง ระยะไข่ 15 – 20 วัน หลังจากไข่ฟักเป็นตัวอ่อน 2-3 วัน แม่แมงมุมจะวางไข่กลุ่มใหม่ทันที ตัวอ่อนเติบโตโดยการลอกคราบหลายครั้งจนเป็นตัวเต็มวัย หากินกลางวันโดยการจับเหยื่อกินโดยตรง ไม่ชักใยดักเหยื่อ เมื่อจับแมลงวันผลไม้ได้แล้วจะใช้เขี้ยวแทงเข้าไปในตัวเหยื่อ ใช้เวลาดูดกินแมลงวันผลไม้ตัวหนึ่งประมาณ 1 ชั่วโมง แมงมุมชนิดนี้พบปริมาณประชากรมากที่สุดบริเวณหญ้าขน หญ้าไทรที่ขึ้นใต้ร่มเงาไม้ผลต่าง ๆ

การศึกษาประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตาหกเหลี่ยมต่อแมลงวันผลไม้ *B. correcta* พบว่า แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้ ตัวอ่อนเพศเมีย แมงมุมเพศผู้กล่องละ 1, 2, 3 ตัวและแมงมุมเพศเมียกล่องละ 1, 2, 3 ตัว ตามลำดับ มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ยต่อวัน 3.7, 3.9, 2.8, 5.8, 7.7, 3.2, 7.1, 8.7 ตัวตามลำดับ ส่วนกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว กินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 7.0 ตัวต่อวัน

แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้และตัวอ่อนเพศเมียมีอัตราการกินแมลงวันผลไม้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เช่นเดียวกับแมงมุมเพศผู้กับเพศเมียกล่องละ 1 ตัวหรือแมงมุมเพศเมียกล่องละ 2 ตัวกับกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 1 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้หรือตัวอ่อนเพศเมียมีอัตราการกินแมลงวันผลไม้แตกต่างจากแมงมุมเพศผู้หรือเพศเมียกล่องละ 1 ตัว แมงมุมเพศผู้กล่องละ 1 ตัว, 2 ตัว, 3 ตัว หรือแมงมุมเพศเมียกล่องละ 1 ตัว, 2 ตัว, 3 ตัว ตามลำดับ มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้ในระหว่างเพศเดียวกันที่มีความหนาแน่นต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำนำ

แมลงวันผลไม้หรือแมลงวันทองอยู่ในวงศ์ Tephritidae อันดับ Diptera ทำลายผลไม้ให้เสียหาย เน่าเสียเก็บเกี่ยวผลผลิตไม้ได้คุณภาพต่ำ เป็นปัญหาทางเศรษฐกิจ ต้องมีการป้องกันกำจัดทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ก่อให้เกิดปัญหาพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในผลผลิต และสภาพแวดล้อมและปัญหาด้านกักกันพืช ซึ่งต่างประเทศใช้เป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้า เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ กำหนดให้ผลไม้ที่นำเข้าประเทศต้องผ่านขบวนการกำจัดแมลงวันผลไม้ เช่น การอบไอน้ำร้อน การรมสาร เป็นต้น ความเสียหายของผลผลิตจากแมลงวันผลไม้ทางเศรษฐกิจต่อผลไม้ไทยมีมูลค่าไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี ในการป้องกันกำจัดและช่วงหลังการเก็บเกี่ยวก่อนการส่งออก ดังนั้นแมลงวันผลไม้จึงเป็นศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยที่เกษตรกรผู้ทำสวนผลไม้ประมาณ 80% ของประเทศต้องแก้ปัญหาในการผลิต (มนตรี, 2542)

ระยะไข่ ระยะหนอนของแมลงวันผลไม้อยู่ในผลไม้ ระยะดักแด้อยู่ในดิน ส่วนระยะตัวเต็มวัยหากินตามพืชอาศัยทั่วไป เคลื่อนไหวค่อนข้างช้า หากินเวลาเช้า ชอบหลบตามร่มเงาในเวลาบ่ายหรือเวลาร้อนจัด ผสมพันธุ์ในเวลาเย็น ตอนพลบค่ำ วางไข่ในเวลากลางวัน *Bactrocera correcta* (Saunders) เป็นแมลงวัน

ผลไม้ชนิดหนึ่งใน 10 ชนิด ที่มีความสำคัญและพบเสมอในประเทศไทย นิสัยว่องไว ทำลายผลไม้ตั้งแต่ผลเล็ก ๆ และยังแข็งอยู่ เช่น ฝรั่งอ่อนอายุประมาณ 1 เดือน ดังนั้น การป้องกันกำจัดจะยากกว่าแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมีระยะเวลาทำลายพืชที่กว้างกว่าคือ ทำลายทั้งผลอ่อนและผลแก่ การป้องกันกำจัดต้องดำเนินการตลอดระยะการพัฒนาของผล มีเขตแพร่กระจายในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ มีพืชอาศัยไม่น้อยกว่า 36 ชนิด

แมงมุมวงศ์ Oxyopidae มี 9 สกุล และมีเขตแพร่กระจายทั่วโลก คำว่า Oxyopidae มาจากภาษากรีกมีความหมายว่า “sharp sighted” หรือ “good vision” เนื่องจากเป็นแมงมุมที่มีสายตาดีมาก ชื่อสามัญภาษาไทยเรียกว่า “แมงมุมตาหกเหลี่ยม” เนื่องจากมี 8 ตา แต่มีตา 6 ตาที่เรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม ชื่อสามัญภาษาอังกฤษเรียกว่า “lynx spider” เนื่องจากมีนิสัยว่องไว กระโดดไปตามกิ่งไม้ต่าง ๆ และล่าเหยื่อได้รวดเร็ว แมงมุมวงศ์นี้หากินกลางวัน ไม่ชักใยดักเหยื่อ แต่ล่าเหยื่อกินโดยตรง อาศัยหากินตามต้นไม้ พุ่มไม้ วัชพืช หญ้า ใบไม้ที่ร่วงหล่นตามพื้นดิน ถุงไข่ (egg sac) มีรูปทรงเกือบกลม แบน ติดตามกิ่งไม้ ใบไม้ แม่แมงมุมเฝ้าไข่จนไข่ฟักเป็นตัวอ่อน (Sherriffs, 1951)

ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีรายงานพบแมงมุมวงศ์ Oxyopidae 5 สกุล ได้แก่ *Hamataliwa Megulia, Oxyopes, Peucetia* และ *Tapponia* *Oxyopes* เป็นสกุลที่พบชนิดต่าง ๆ มากที่สุด แมงมุมสกุล *Oxyopes* มีลักษณะรูปทรงของส่วนหัวอก (carapace) โดยเฉพาะคือสูงและกลม ด้านหน้าส่วนหัวสูงและเป็นรูปตัด ตา 8 ตาเรียงแบบ 2-2-2-2 ตากลางคู่หน้าตั้งอยู่กึ่งกลางระหว่างด้านใต้ริมหัวและตากลางแถวหลัง มีเส้นสีดำพาดจากตากลางแถวหน้าผ่าน (clypeus) และเขี้ยว (chelicerae) ไปจนถึงปลายฐานเขี้ยว ส่วนท้องอ้วนทางตอนหน้าท้องและยาวเรียวไปทางปลายท้อง ลายบนท้องมีลักษณะแตกต่างกันไป ขายาวมีหนามยาวและตั้งขึ้นทั่วไป (Murphy and Murphy, 2000)

ในประเทศไทยมีรายงานพบแมงมุม วงศ์ Oxyopidae 3 สกุล 5 ชนิด คือ *Hamataliwa sanmenensis* Song et Zheng, *Oxyopes javanus* Thorell, *O. lineatipes* (C.L.Koch). *Oxyopes* sp. และ *Peucetia* sp. (วิภาดา, 2544) ชนิดที่พบในพืชเศรษฐกิจทุกชนิดที่ได้สำรวจ เช่น ข้าว กล้วยไม้ ถั่วเขียว กระเจี๊ยบเขียว มันเทศ ส้มโอ ส้มเขียวหวาน และตามวัชพืชต่าง ๆ ของประเทศไทย ได้แก่ *O. javanus* และ *O. lineatipes* (วิภาดา, 2541) จากการสำรวจชนิดและปริมาณแมงมุมด้วยสวิงจับแมลงตลอดฤดูปลูกข้าวทั้งในนาข้าวและบนคันนาปี พ .ศ. 2517 ที่จังหวัดอุบลราชธานี เชียงราย และปทุมธานี พบว่าทั้งในนาข้าวและบนคันนาที่จังหวัดอุบลราชธานีพบปริมาณประชากร *O. javanus* มากกว่า *O. lineatipes* ที่จังหวัดเชียงรายพบปริมาณประชากร *O. javanus* และ *O. lineatipes* เท่า ๆ กัน ส่วนที่จังหวัดปทุมธานี พบปริมาณประชากร *O. lineatilpes* มากกว่า *O. javanus* (Patarakulpong, 1977) การสำรวจชนิดและปริมาณประชากรแมงมุมในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว กล้วยไม้ ถั่วเขียว กระเจี๊ยบเขียว มันเทศ ส้มโอ ส้มเขียวหวาน และวัชพืชรอบ ๆ แปลงปลูกพืชเศรษฐกิจด้วยสวิงจับแมลงในเขตภาคกลางของประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2535 – 2540 พบปริมาณประชากร *O. lineatipes* มากกว่า *O. javanus* และในพืชบาง

ชนิดพบปริมาณประชากร *O. lineatipes* มากกว่าแมงมุมชนิดอื่น เช่น ในกล้วยไม้ ถั่วเขียว กระเจี๊ยบเขียว มันเทศ และในวัชพืชรอบ ๆ แปลงปลูกพืชเศรษฐกิจ (วิภาดา, 2541)

แมงมุมชนิด *Oxyopes lineatipes* มีเขตแพร่กระจายกว้างขวาง มีรายงานพบในประเทศ จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน เวียดนาม ไทย มาเลเซีย สิงค์โปร์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินด์ บังคลาเทศ อินเดีย (Barrion & Litsinger, 1995 ; Daxiang et al, 1999 ; Okuma et. al. 1993) Barrion & Litsinger (1995) และ Okuma et. al. (1993) รายงานว่า แมงมุมสกุล *Oxyopes* มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมประชากรแมลงศัตรูข้าว จากการทดสอบเบื้องต้นพบว่า แมงมุม *O. lineatipes* กินแมลงวันผลไม้ มีที่อยู่อาศัยส่วนใหญ่ตามวัชพืชใต้ร่มเงาไม้ผล โดยเฉพาะหญ้าขน , หญ้าไทร ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยเดียวกับตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ (มนตรี, 2542) จึงสมควรศึกษารายละเอียดต่าง ๆ ของแมงมุม *O. lineatipes* เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการบริหารแมลงวันผลไม้โดยวิธีผสมผสานต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการจับแมงมุม ได้แก่ สวิงจับแมลง ท่อนไม้กลมยาว กล่องพลาสติกใสขนาด 10 x 10 x 10 เซนติเมตร กระดาษซับ ปากคีบ พู่กัน หลอดแก้วทดลอง สารเคมี ได้แก่ alcohol 75% ethyl acetate

2. อุปกรณ์ในการเพาะต้นถั่ว ได้แก่ เมล็ดถั่วเขียว กระดาษซับ จานแก้ว petridish

3. อุปกรณ์ในการทดลอง ได้แก่ กล่องพลาสติกใสขนาด 7.5 x 5.5 x 3 และ 15 x 29 x 8.5 เซนติเมตร แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis*, *B correcta* กล้อง stereomicroscope

วิธีการ

1. การศึกษาชนิดแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้

สำรวจและเก็บตัวอย่างแมงมุมในสวนผลไม้เกษตรกรจังหวัดต่างๆ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี พิจิตร ชัยนาท สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครศรีธรรมราช และสงขลา นำแมงมุมแต่ละชนิดใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 10 x 10 x 10 เซนติเมตร กล่องละ 1 ตัว ปูพื้นกล่องด้วยกระดาษซับและพรมน้ำให้ชื้น ให้แมงมุมอดอาหาร 1 วัน ใส่แมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera dorsalis* (Hendel) กล่องละ 5 ตัวต่อวัน เพื่อทดสอบหาชนิดแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้

2. การศึกษาอนุกรมวิธานแมงมุมตาหกเหลี่ยม *Oxyopes lineatipes*

จับแมงมุมตาหกเหลี่ยมจากพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ และวัชพืชรอบ ๆ แปลงด้วยสวิงจับแมลง ฆ่าด้วย ethyl acetate ดองในแอลกอฮอล์ 75% นำมาศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานใต้กล้องจุลทรรศน์ในห้องปฏิบัติการ บรรยายลักษณะและวาดรูป

3. การศึกษาชีววิทยาและพฤติกรรมการจับกินเหยื่อของแมงมุมตาหกเหลี่ยม

ศึกษาทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในธรรมชาติ สำหรับในห้องปฏิบัติการจับแมงมุมตาหกเหลี่ยมใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 15 x 29 x 8.5 ซม. กล่องละ 1 ตัว ปูพื้นกล่องด้วยกระดาษซับเปียกน้ำ ปล่อย

แมลงวันผลไม้ *Bactrocera correcta* กล่องละ 5 ตัว สังเกตบันทึกพฤติกรรมการจับเหยื่อกินของแมงมุม สำหรับแม่แมงมุมที่ตั้งท้อง สังเกตบันทึกระยะไข่และจำนวนตัวอ่อนที่ฟักจากไข่ 1 ถุง ส่วนในธรรมชาติ สังเกตบันทึกเขตแพร่กระจาย พืชอาศัย บริเวณที่อาศัยหากิน บริเวณที่วางไข่

4. การศึกษาประสิทธิภาพการกินแมลงวันผลไม้ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม

เลี้ยงขยายปริมาณแมลงวันผลไม้ *B. correcta* ในห้องปฏิบัติการให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้เป็นเหยื่อสำหรับการทดลอง ซึ่งมี 9 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีแตกต่างกันที่วัยหรือเพศหรือจำนวนแมงมุมที่ใช้ทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ ปล่อยแมงมุมลงในกล่องพลาสติกใสขนาด 15 x 29 x 8.5 ซม. ภายในกล่องวางจานแก้วซึ่งเพาะต้นถั่วเขียวอายุ 1 สัปดาห์ จานละ 20 ต้น **กรรมวิธีที่ 1** ใส่แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้ขนาดลำตัวยาว 6.5 มม. กล่องละ 1 ตัว **กรรมวิธีที่ 2** ใส่แมงมุมตัวอ่อนเพศเมียขนาดลำตัวยาว 7.5 มม. กล่องละ 1 ตัว **กรรมวิธีที่ 3** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศผู้ กล่องละ 1 ตัว **กรรมวิธีที่ 4** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศเมีย กล่องละ 1 ตัว **กรรมวิธีที่ 5** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศผู้ กล่องละ 2 ตัว **กรรมวิธีที่ 6** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศเมีย กล่องละ 2 ตัว **กรรมวิธีที่ 7** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมีย เพศละ 1 ตัว **กรรมวิธีที่ 8** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศผู้ กล่องละ 3 ตัว **กรรมวิธีที่ 9** ใส่แมงมุมตัวเต็มวัยเพศเมีย กล่องละ 3 ตัว หลังอดอาหาร 1 วัน ปล่อยแมลงวันผลไม้ใส่แต่ละกรรมวิธีกล่องละ 10 ตัว วันต่อมานับจำนวนแมลงวันผลไม้ที่เหลือจากการกิน เพื่อหาจำนวนแมลงวันผลไม้ที่ถูกกิน และเพิ่มจำนวนแมลงวันผลไม้ในแต่ละกรรมวิธีในแต่ละกล่องให้ครบ 10 ตัว ใช้เวลาในการทดลอง 15 วัน

เวลาและสถานที่

1. เวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2543 **สิ้นสุด** กันยายน 2546

2. สถานที่

2.1 สวนผลไม้เกษตรกรจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้ นครปฐม สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี พิจิตร ชัยนาท สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ชุมพร นครศรีธรรมราช และสงขลา

2.2 ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาชนิดแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ชนิดแมงมุมที่กินแมลงวันผลไม้ ดังนี้ วงศ์ Araneidae ได้แก่ *Argiope catenulata* (Doleschall), *Cyclosa spirifera* Simon, *Cyclosa* sp., *Eriovixia laglaisei* (Simon), *Leucauge fastigata* (Simon), *Zilla* sp., *Cyrtophora unicolor* (Doleschall). วงศ์ Clubionidae ได้แก่ *Chiracanthium* sp., *Clubiona* sp. วงศ์ Lycosidae พบ 1 ชนิด คือ *Pardosa*

pseudoannulata Boes et. Str., วงศ์ Oxyopidae ได้แก่ *Hamataliwa* sp., *Oxyopes javanus* Thorell, *O. lineatipes* (C.L.Koch). วงศ์ Salticidae ได้แก่ *Epeus flavobilineatus* (Doleschall), *Evarcha flavocincta* (C.L.Koch), *Harmochirus* sp., *Hasarius* sp., *Phintella versicolor* (C.L. Koch), *P. vittata* (C.L.Koch), *Telamonia dimidiata* Simon, *T. festiva* (Thorell), วงศ์ Theridiidae ได้แก่ *Argyrodes fissifrons* O.P. Cambridge, *Chrysso* sp., *Theridion sterninotatum* Boes. et. Str, *Tyrorida ventralis* Thorell

2. อนุกรมวิธานของแมงมุมตาหกเหลี่ยม

แมงมุมตาหกเหลี่ยมมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oxyopes lineatipes* (C. L. Koch) 1847 มีชื่อพ้องดังนี้

Sphasus lineatipes C.L.Koch, 1848

Oxyopes lineatipes Simon, 1864

ลำตัวเพศผู้และเพศเมียยาวเฉลี่ย 7.2 และ 8.5 มม. ตามลำดับ carapace ค่อนข้างกลม สูง มีความยาวมากกว่าความกว้าง สีเหลืองทองและเป็นมัน มีแถบสีส้มและขนบางสั้นบนแถบนี้ตามยาวกลาง carapace 2 แถบและด้านข้าง ๆ ละ 2 แถบ ตา 8 ตาสีดำแบบ diurnal eyes และเรียงเป็น 4 แถว ๆ ละ 2 ตา คือ ตากลางแถวหน้า ตาข้างแถวหน้า ตาข้างแถวหลัง ตากลางแถวหลัง ตามลำดับ การเรียงของตาแบบนี้ ทำให้มองเห็นตา 6 ตาเรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม ความกว้างของ clypeus มากกว่าระยะห่างของตากลางคู่หน้ามาก มีเส้นสีดำพาดจากด้านหน้าของตากลางคู่หน้าตรงไปยังฐานของ chelicerae chelicerae มี boss และ scopula มีฟันแถวหน้า 2 ซี่ แถวหลัง 1 ซี่ maxillae ยาว ขนานกัน ความยาวของ labium มากกว่าความกว้าง sternum รูปหัวใจ มีความกว้างเท่ากับความยาว ขาสีเหลืองทองยาวเรียวไปทางปลายขาและมีหนามยาวชี้ขึ้นทั่วไป ท้องสีเหลืองทองยาวเรียวไปทางปลายท้อง มีแถบสีส้มสลับสีเงินตามยาวกลางท้องและด้านข้างบนท้อง ตรงกลางใต้ท้องมีแถบสีดำพาดตรงจากด้านหน้าท้องไปยังปลายท้อง spinnerets มี 6 อัน การจำแนกชนิด เพศผู้ดูที่ลักษณะของ tibia apophysis ของ palp (Fig. 1B) เพศเมียดูที่ลักษณะของ epigynum (Fig. 1C)

3. ชีววิทยาและพฤติกรรมการจับกินเหยื่อ

แมงมุมตาหกเหลี่ยม *O. lineatipes* เป็นแมงมุมที่ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว แม่แมงมุมวางไข่เป็นกลุ่ม มีใยสีขาวหุ้ม เรียกว่าถุงไข่ ถุงไข่มีลักษณะกลมแบน ติดอยู่ตามกิ่งไม้ ใบไม้ แม่แมงมุมเฝ้าไข่จนกว่าไข่ฟักเป็นตัวอ่อน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15-20 วัน ถุงไข่ 1 ถุง ให้ตัวอ่อนประมาณ 40-110 ตัว หลังจากไข่ฟักเป็นตัวอ่อน 2-3 วัน แม่แมงมุมจะวางไข่กลุ่มใหม่ทันที ตัวอ่อนลอกคราบหลายครั้งจนเป็นตัวเต็มวัย

แมงมุมตาหกเหลี่ยมอาศัยอยู่ตามพืชเศรษฐกิจทุกชนิด เช่น นาข้าว คันนา พืชไร่ พืชสวน ไม้ดอกไม้ประดับ ประชากรของแมงมุมตาหกเหลี่ยมพบมากบริเวณภาคกลางของประเทศ ในพืชบางชนิด เช่น กล้วยไม้ กระเจี๊ยบเขียว มันเทศ ถั่วเขียว ข้าวโพด และคันนา พบประชากรของแมงมุมตาหกเหลี่ยมมากกว่าแมงมุมชนิดอื่น ๆ (วิภาดา, 2541) แหล่งที่พบประชากรแมงมุมตาหกเหลี่ยมมากที่สุด ได้แก่ ใน

วัชพืชจำพวก หญ้าขน หญ้าไทร ที่ขึ้นใต้ร่มเงาของไม้ผล หากินกลางวันโดยจับเหยื่อกินโดยตรง ไม่ชักใยดักเหยื่อ สามารถจับเหยื่อได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีสายตาดีมากและมีนิสัยว่องไว ชอบกระโดดไปตามกิ่งไม้พุ่มไม้ต่าง ๆ อาหารหลักคือแมลงวันผลไม้ เมื่อตะครุบจับแมลงวันผลไม้ได้แล้ว จะใช้เขี้ยวแทงเข้าไปในตัวเหยื่อ บริเวณที่ชอบแทงคือ รอยต่อระหว่างหัวและอก ใต้ท้อง บนท้อง แมงมุมบางตัวแทงเหยื่อเพียงครั้งเดียว แต่บางตัวแทงหลายจุด โดยเมื่อดูดกินจุดแรกจนบริเวณนั้นแห้งแล้วจะค่อย ๆ เลื่อนไปแทงจุดอื่นของเหยื่อ ต่อไป หลังจากแทงเหยื่อแล้ว จะปล่อยน้ำย่อยเพื่อย่อยเนื้อเยื่อเหยื่อให้กลายเป็นของเหลว ค่อย ๆ ดูดกินเหยื่อจนแห้ง ใช้เวลาดูดกินแมลงวันผลไม้ตัวหนึ่ง ๆ ประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนี้จะปล่อยทิ้งเหยื่อ ซึ่งยังคงสภาพเป็นโครงแมลง

4. การศึกษาประสิทธิภาพการกินแมลงวันผลไม้ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม

แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้กล่องละ 1 ตัว ตัวอ่อนเพศเมียกล่องละ 1 ตัว แมงมุมเพศผู้ กล่องละ 1, 2, 3 ตัวและแมงมุมเพศเมียกล่องละ 1, 2, 3 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ยต่อวันเท่ากับ 3.7, 3.9, 2.8, 5.8, 7.7, 3.2, 7.1, 8.7 ตัว ตามลำดับ ส่วนกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 1 ตัวกับเพศเมีย 1 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 7.0 ตัวต่อวัน (Table 1)

แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้และตัวอ่อนเพศเมีย มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 3.7 และ 3.9 ตัว/วัน ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แมงมุมเพศผู้และแมงมุมเพศเมียกล่องละ 1 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เท่ากับ 2.8 และ 3.2 ตัว/วันตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แมงมุมเพศผู้ แมงมุมเพศเมีย กล่องละ 2 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เท่ากับ 5.8 และ 7.1 ตัว/วัน ตามลำดับ ซึ่งตัวเมียกินมากกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แมงมุมเพศผู้ 3 ตัว และแมงมุมเพศเมีย 3 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เท่ากับ 7.7 และ 8.7 ตัว/วัน ตามลำดับ ซึ่งตัวเมียกินมากกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 1 ตัวกับแมงมุมเพศเมีย 1 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เท่ากับ 7.0 ตัว/วัน ไม่แตกต่างจากกล่องที่ใส่แมงมุมเพศเมีย 2 ตัว (Table 2)

ผลการทดลองพบว่า แมงมุมตัวอ่อนทั้งเพศผู้และเพศเมีย ระยะก่อนเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ยสูงกว่าแมงมุมตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย

แมงมุมทั้งเพศผู้และเพศเมีย ถ้าใส่จำนวนแมงมุมต่อกล่องมากขึ้น จะกินแมลงวันผลไม้มากขึ้น โดยแมงมุมเพศผู้ใส่กล่องละ 1, 2, 3 ตัว กินแมลงวันผลไม้ได้เฉลี่ย 2.8, 5.8, 7.7 ตัวต่อวันตามลำดับ และแมงมุมเพศเมียใส่กล่องละ 1, 2 และ 3 ตัว กินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 3.2, 7.1 และ 8.7 ตัวต่อวันตามลำดับ ซึ่งในสภาพที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์ การใส่แมงมุมตาหกเหลี่ยมมากกว่า 1 ตัวต่อกล่อง จะไม่เกิดการต่อสู้กินกันเอง (cannibalism) ซึ่งแตกต่างจากแมงมุมสุนัขป่า *Lycosa pseudoannulata* ถ้าใส่ไปในกระถางทดลองมากกว่า 1 ตัว จะเกิดการต่อสู้กินกันเอง ทำให้ประสิทธิภาพการกินลดลง แม้อยู่ในสภาพที่มีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลซึ่งเป็นเหยื่อของแมงมุมชนิดนี้อย่างสมบูรณ์ (วิภาดา, 2529) ดังนั้นการเลี้ยงขยายแมงมุมตาหกเหลี่ยมให้ได้ปริมาณมากในห้องปฏิบัติการจึงมีแนวโน้มที่จะทำได้ เพราะแมงมุมตาหกเหลี่ยมจะไม่

กินกันเอง ในสภาพที่มีเหยื่ออุดมสมบูรณ์ และในธรรมชาติ ก็สามารถจัดการให้เพิ่มความหนาแน่นต่อพื้นที่ได้ ซึ่งจะเพิ่มประสิทธิภาพในการลดประชากรของศัตรูพืชเช่นแมลงวันผลไม้ได้

แมงมุมเพศผู้กล่องละ 1 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 2.8 ตัวต่อวัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแมงมุมเพศเมียกล่องละ 1 ตัว ซึ่งมีอัตราการกินเฉลี่ย 3.2 ตัวต่อวัน แต่ถ้าใส่แมงมุมเพศผู้ 2 และ 3 ตัวต่อกล่อง มีอัตราการกินต่อวันเท่ากับ 5.8 และ 7.7 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้น้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกล่องที่ใส่แมงมุมเพศเมียในอัตราเดียวกัน ซึ่งแมงมุมเพศเมีย 2 และ 3 ตัวต่อกล่อง มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ยต่อวัน 7.1 และ 8.7 ตัวตามลำดับ แสดงว่าแมงมุมเพศเมียที่มีมากกว่า 1 ตัวต่อกล่อง จะมีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ยมากกว่ากล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ที่มีอัตราต่อกล่องเท่ากันและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2)

แมงมุมเพศเมียกล่องละ 2 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 7.1 ตัวต่อวัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 1 ตัวกับเพศเมีย 1 ตัว ซึ่งมีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 7.0 ตัวต่อวัน แต่จะมีอัตราการกินมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 2 ตัว ซึ่งมีอัตราการกินเฉลี่ย 5.8 ตัวต่อวัน

จากผลการทดลองจะเห็นว่าแมงมุมตาหกเหลี่ยมเป็นตัวห้ำที่สามารถใช้ลดประชากรของแมลงวันผลไม้ลงได้อย่างมีประสิทธิภาพแมงมุมชนิดนี้มีปริมาณประชากรสูงในพืชเศรษฐกิจเกือบทุกชนิดและในวัชพืชรอบไร่ นา สวน มีเขตแพร่กระจายกว้างขวางทั่วประเทศ (วิภาดา, 2541, 2544) แหล่งที่พบแมงมุมตาหกเหลี่ยมสูงสุดคือ ในวัชพืชที่อยู่ใต้ร่มเงาของไม้ผลต่าง ๆ จึงควรเก็บแปลงวัชพืชไว้บ้างเพื่อเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยเพาะพันธุ์ของแมงมุมตาหกเหลี่ยม

สรุปผลการทดลอง

แมงมุมตาหกเหลี่ยม (*Oxyopes lineatipes*) เป็นแมงมุมชนิดหนึ่งที่กินแมลงวันผลไม้เป็นอาหารหลัก มีเขตแพร่กระจายในพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ เกือบทุกชนิดและในวัชพืชต่าง ๆ ทั่วประเทศ อยู่ในวงศ์ Oxyopidae เพศผู้มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 7.2 มม. เพศเมีย 8.5 มม. หัวและอกสีเหลืองทองและเป็นมัน ขาสีเหลืองทองยาวเรียวไปทางปลายขา มีหนามยาวชี้ขึ้นทั่วไป 6 ตาใน 8 ตาของทั้งหมดเรียงเป็นรูปหกเหลี่ยม ท้องยาวเรียวไปทางปลายท้อง เป็นแมงมุมที่ขยายพันธุ์ได้เร็ว วางไข่เป็นกลุ่มมีใยสีขาวหุ้ม ลักษณะถุงไข่กลมแบน แม่แมงมุมเฝ้าไข่จนกว่าไข่จะฟักเป็นตัวอ่อน ถุงไข่ 1 ถุงให้ตัวอ่อนประมาณ 40 – 110 ตัว ตัวอ่อนลอกคราบหลายครั้งจนเป็นตัวเต็มวัย หากินกลางวันโดยจับเหยื่อกินโดยตรงและรวดเร็ว นิสัยว่องไว เมื่อจับแมลงวันผลไม้ได้แล้ว จะใช้เขี้ยวแทงเข้าไปในตัวเหยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างหัวและอกหรือใต้ท้องหรือบนท้อง ใช้เวลาดูดกินแมลงวันผลไม้ตัวหนึ่ง ๆ ประมาณ 1 ชั่วโมง

การศึกษาประสิทธิภาพการกินของแมงมุมตาหกเหลี่ยมต่อแมลงวันผลไม้พบว่า แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้และตัวอ่อนเพศเมีย กินแมลงวันผลไม้ได้เฉลี่ย 3.7 และ 3.9 ตัวต่อวัน ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แมงมุมเพศผู้กล่องละ 1, 2 และ 3 ตัว กินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 2.8, 5.8, 7.7 ตัวต่อวัน ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แมงมุมเพศเมียกล่องละ 1, 2, และ 3 ตัว กินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 3.2, 7.1, 8.7 ตัวต่อวัน ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แมงมุมตัวอ่อนเพศผู้และตัวอ่อนเพศเมียกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ยต่อวัน 3.7 และ 3.9 ตัว ตามลำดับ มากกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแมงมุมเพศผู้และเพศเมียกล่องละ 1 ตัว ซึ่งมีอัตราการกินต่อวัน2.8 ตัวและ3.2 ตัว ตามลำดับ แมงมุมเพศเมียกล่องละ 2 ตัว มีอัตราการกินแมลงวันผลไม้เฉลี่ย 7.1 ตัวต่อวัน มีอัตราการกินไม่แตกต่างจากกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 1 ตัวกับเพศเมีย 1 ตัว ซึ่งมีอัตราการกินต่อวัน 7.0 ตัว แต่จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 2 ตัว ซึ่งมีอัตราการกิน 5.8 ตัวต่อวัน สำหรับกล่องที่ใส่แมงมุมเพศเมีย 3 ตัว จะมีอัตราการกิน 8.7 ตัวต่อวันมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกล่องที่ใส่แมงมุมเพศผู้ 3 ตัว ซึ่งมีอัตราการกินเฉลี่ย 7.7 ตัวต่อวัน

เอกสารอ้างอิง

มนตรี จิรสุรัตน์ . 2542. แมลงวันผลไม้ หน้า 128 – 145. *ใน* : เอกสารวิชาการเรื่อง แมลงศัตรูไม้ผล . กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผล สมุนไพรและเครื่องเทศ , กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

วิภาดา วังศิลาบัตร . 2529. ประสิทธิภาพการกินของแมงมุมไลโคซ่า (*Lycosa pseudoannulata*) ต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. ว. กีฏ. สัตว. 8 (3) : 120 – 126.

_____ . 2541. ความหลากหลายของชนิดแมงมุมในระบบนิเวศพืชเศรษฐกิจบางชนิด . หน้า 121 – 144. *ใน* : การประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ประจำปี 2541 ครั้งที่ 11, 3 – 6 มีนาคม 2541. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

_____ . 2544. แมงมุมในสวนส้ม. เอกสารวิชาการ. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. 108 หน้า.

Barrion, A. T. and J. A. Litsinger. 1995. Riceland Spiders of South and Southeast Asia. IRRI. 700 p.

Daxiang, S., Z. Mingsheng. and C. Jun. 1999. The spiders of China. Hebei Science and Technology Publishing House. 640 p.

Murphy, F. and J. Murphy. 2000. An introduction to the spiders of Southeast Asia. Malaysian Nature Society. 625 p.

Okuma, C, N. Q. Kamal, Y. Hirashima, Md. Z. Alam and K. Ogata. 1993. Illustrated monograph of the rice field spiders of Bangladesh. Institute of Postgraduate Studies in Agriculture, Salna, Gaxipur Bangladesh. 93 p.

Patarakulpong, W. 1977. A preliminary survey of spider fauna and their predation in the paddy fields of Thailand. M.S. Thesis. Kasetsart university. 59 p.

Sherriffs, W. R. 1951. Some Oriental spider of the genus *Oxyopes*. Proc. Zool. Soc. London. 120 : 651 – 677.

Table 1. Consumption rates of lynx spider , *Oxyopes lineatipes*, of different stages or sex or densities/box on fruit fly, *Bactrocera correcta.*

Spider No.	Young stage male	Young stage female	1 male	2 male	3 male	1 female	2 female	3 female	1 male + 1 female
1	3.47	3.93	2.53	6.53	7.20	3.13	7.60	8.33	6.73
2	3.73	3.53	2.67	6.60	7.53	2.60	7.00	8.20	7.20
3	4.20	3.87	2.60	6.73	7.50	3.40	7.60	8.87	5.07
4	3.60	4.27	2.47	5.80	8.20	3.00	7.53	9.13	5.80
5	3.53	3.53	2.80	6.00	7.93	3.53	7.20	9.07	5.07
6	3.87	3.6	3.00	6.67	7.73	3.33	7.33	8.80	8.13
7	3.73	3.93	2.80	4.67	8.27	3.07	6.53	8.87	7.73
8	3.73	3.87	2.73	5.27	7.87	3.60	7.13	8.33	7.47
9	3.93	4.47	2.87	4.6	7.07	3.20	7.13	8.80	8.07
10	3.67	4.33	3.27	5.20	8.07	2.80	5.73	8.80	8.47
X ±	3.75±	3.93±	2.77±	5.81±	7.74±	3.17±	7.08±	8.72±	6.97±
S.D	0.21	0.33	0.24	0.83	0.41	0.32	0.57	0.32	1.26
CV (%)	5.6	8.4	8.7	14.3	5.3	10.1	8.0	3.7	18.0

X = average consumption rate of spider

SD = standard deviation

Table 2. Comparison of consumption rates of lynx spider, *O. lineatipes,* of different stages or sex or densities on fruit fly, *B. correcta.*

Stage or sex and densities of spiders	prey consumption / day [1/]
one young male	3.7 b
one young female	3.9 b
one male	2.8 a
two males	5.8 c
three males	7.7 e
one female	3.2 a
two females	7.1 d
three females	8.7 f
one male + one female	7.0 d
C.V. (%)	11.2

[1/] Figures with the same letter in the same column are not significantly different at the 5% level by DMRT

Study on Species, Ecology and Predation Efficiency of Spiders on Fruit Fly

Wipada Vungsilabutr, Amporn Winotai, Montri Jirasurat
Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research Development Office

Abstract

Bactrocera correcta (Saunders), a fruit fly, is an economic and important insect pest of fruit trees. Host ranges of this fruit fly are wide; *B. correcta* can cause damage to the fruits from young to mature stages. *Oxyopes lineatipes*, lynx spider, is a predator of *B. correcta*. Lynx spider inhabites in weed and economic crops such as rice, orchid, mungbean, sweet potato, okra, tangerine and pummelo. Taxonomic character, biology and predation efficiency of lynx spider were studied. Predation efficiency study was done in laboratory in CRD design with 9 treatments for 10 replications. The treatments were the different stages, sexes and densities of spider : 1 young stage of male (6.5 mm in length), 1 young stage of female (7.5 mm in length), 1, 2 and 3 males and 1, 2 and 3 females per box. Spiders in each treatment were in plastic box (in size of 15x29x8.5 cm) with 7 day old seedling of mungbean and were daily fed with 10 fruit flies (*B. correcta*). The numbers of fruit flies daily consumed were recorded. The trial lasted 15 days. The result of taxonomic and biological studies revealed that the body length of male and female spiders were 7.2 and 8.5 mm respectively. The color of the head, cephalothorax and legs are shiny- golden yellow. Eggs are laid in a cluster of 40 – 110 eggs; incubation period last 15 – 20 days. The predation efficiency of lynx spider revealed that daily consumption of 1 young male, 1 young female, 1, 2 and 3 males, 1, 2 and 3 females and 1 male + 1 female per box were in average 3.7, 3.9, 2.8, 5.8, 7.7, 3.2, 7.1, 8.7 and 7.0 fruit flies respectively. Daily predation between young male with young female, one male with one female, two females with one male + one female were not significantly different. The highest predation rate, consuming 8.72 fruit flies per day, was that of the 3 female spider per box. There were no consuming interferance or cannibalism observed at high density of prey, 10 fruit flies/day, among different density (1-3 spiders per box) of lynx spider comparing with wolf spider *Lycosa pseudoannulata.*

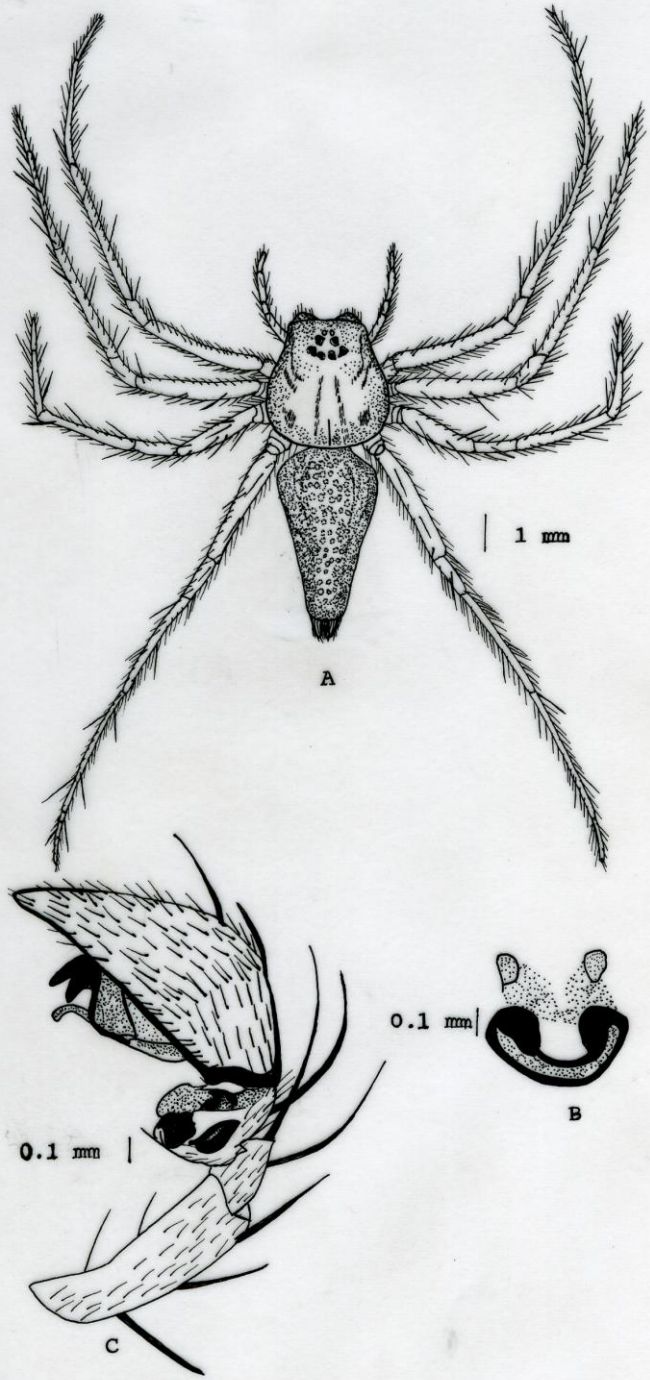


Figure 1 Oxyopes lineatipes (C.L.Koch). (Oxyopidae). female (A); epigynum (B); palp (C).

อนุกรมวิธานและการเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชเพื่อการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน

Taxonomy and Preservation of Some Plant Pathogenic Fungi and Bacteria for Sustainable Conservation

พัฒนา สนธิรัตน วงศ์ บุญสืบสกุล อรุณศรี วงศ์อุไร
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รัตตา สุทธยาคม นิยม ไข่มุกข์
อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ธารทิพย ภาสบุตร
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของรา และแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 6 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Colletotrichum, Corynespora, Fusarium, Phytophthora, Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* โดยเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคใบจุด ใบไหม้ แอนแทร คโนส โรคเหี่ยว โรคช่อดอกแห้ง โรคเมล็ดด่าง โรครากเน่าโคนเน่า และโรคแคงเกอร์ จากแหล่งปลูก พืชในประเทศ จำนวน 1,386 ตัวอย่าง แยกเชื้อได้ 680 isolate ระหว่างปี 2544-2546 บันทึกลักษณะอาการ ถ่ายภาพ เก็บข้อมูลต่างๆ ในแหล่งปลูก รวมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี จัดจำแนกชื่อชนิด (species) / race / biovar เปรียบเทียบลักษณะ / คุณสมบัติ กับเอกสารการจัดจำแนก ผลจากการศึกษาพบราในสกุล *Colletotrichum* 5 ชนิด คือ *C. acutatum, C. capsici, C. circinans, C. gloeosporioides* และ *C. truncatum* สกุล *Corynespora* 2 ชนิด คือ *C. cassiicola* และ *C. elaeidicola* สกุล *Fusarium* 7 ชนิด 8 form species คือ *F. graminearum, F. moniliforme, F. oxysporum, F. proliferatum, , F. semitectum, F.solani* สกุล *Phytophthora* 6 ชนิด คือ *P. botryosa, P. cinnamomi, P. colocasiae, P. infestans, P. palmivola และ P. parasitica* แบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* แยกได้ 115 isolate จากตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืช 18 ชนิด จำแนกเป็น race 1 biovar 3, race 1 biovar 4, และ race 3 biovar 2 แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* จากตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม แยกได้ 152 isolate จำแนกคุณสมบัติทางชีวเคมี แบ่งได้ 4 กลุ่ม (strain)

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของรา ในสกุล *Aspergillus, Colletotrichum* และ *Fusarium* จากเมล็ดพันธุ์พืชไร่ และผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว โดยเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

รหัสโครงการวิจัย 04109157

ถั่วเขียว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง กลุ่มเครื่องดื่มสมุนไพร ยาสมุนไพร เมล็ดถั่ว เมล็ดธัญพืช จำนวน 597 ตัวอย่าง แยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้ 354 isolate ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เปรียบเทียบลักษณะกับเอกสารในการจัดจำแนก ผลการศึกษาสามารถจำแนกราในสกุล *Colletotrichum* ได้ 1 ชนิด คือ *C. dematium* ราสกุล *Fusarium* ได้ 4 ชนิด คือ *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, และ *F. solani* ราสกุล *Aspergillus* จำแนกได้ 10 ชนิด 1 variety เป็น *A. flavus, A. flavus* var. *columnaris*, *A. tamarii, A.niger, A.aculeatus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. parasiticus*, *A. nidulans*, และ *A. clavatus* ซึ่งพบการปนเปื้อนมากในข้าวกล้อง ข้าวแดง ข้าวมันปู ข้าวเหนียวดำ ลูกเดือย ถั่วลิสง เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ผลิตผลเกษตรในครัวเรือนทุกชนิด ยกเว้นเครื่องเทศ ซึ่งตรวจไม่พบการปนเปื้อน ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อต่อการสร้างสารพิษในอาหารเหลว พบรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สร้างสารแอฟลาทอกซิน ได้ปริมาณ 0.1-99.2 mg/kg และ 18 mg/kg ตามลำดับ ส่วน *F. moniliforme* จำนวน 5 isolate จาก 27 isolate สร้าง Fumonisin B_1(Fb_1) ได้ในปริมาณ 0-244 ng/ml

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 7 สกุล ได้แก่ *Aspergillus, Colletotrichum, Corynespora, Fusarium, Phytophthora, Ralstonia solanacearum* และ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* พบว่าในระยะ 2 ปี 6 เดือน วิธีการเก็บแบบ freeze-drying เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บรักษารา *Aspergillus, Colletotrichum*, *Fusarium* และ *R. solanacearum* ส่วนรา *Corynespora* ยังคงสภาพการมีชีวิตและมีคุณสมบัติเหมือนเดิม ด้วยการเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 8-10 ^{0} ซ. รา *Phytophthora* เก็บได้ดีในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เช่นกัน หรือ เลี้ยงบนอาหาร oat agar ที่อุณหภูมิ 25-27 ^{0}ซ. สำหรับแบคทีเรีย *R. solanacearum* และ *X. campestris* pv. *citri.* เก็บได้ดีในน้ำกลั่น น้ำมันพาราฟิน หรือน้ำมันแร่ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 4-14 ^{0}ซ. แต่การเก็บ *R. solanacearum* ภายใต้น้ำมันพาราฟินที่ 30 ^{0}ซ. เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ระหว่าง 17-27 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของ race และ biovar

คำนำ

การที่ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้นของโลก จึงเป็นธรรมดาของประเทศที่ต้องมีความหลากหลายของชนิดพืช สัตว์และจุลินทรีย์ต่างๆ มากกว่าประเทศในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว เป็นแหล่งที่มีสิ่งที่มีชีวิตอาศัยอยู่ปะปนกันตามธรรมชาติ ตามความสมดุลย์ของระบบนิเวศน์นั้นๆ มากกว่าเขตอื่นหลายเท่าตัว สิ่งที่มีชีวิตเหล่านี้จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาตามปัจจัยภายนอกซึ่งได้แก่ สภาพแวดล้อมในระบบนิเวศน์ การบุกรุกทำลายของมนุษย์และสัตว์อื่นๆ ส่วนปัจจัยภายในเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมซึ่งก็ต้องเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาเช่นกันเพื่อความอยู่รอดและเพื่อความสมดุลย์ตามธรรมชาติของสายพันธุ์เหล่านั้น ประกอบกับประชากรส่วนใหญ่ของประเทศเป็นเกษตรกร รายได้จาก

สินค้าส่งออกของประเทศเกือบครึ่งหนึ่งมาจากผลผลิตผลทางการเกษตร การเกิดมีศัตรูพืชเช่นแมลง วัชพืช สัตว์ศัตรูพืชชนิดต่างๆ มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชจึงเป็นเรื่องธรรมดาสำหรับประเทศที่ทำการเกษตรตลอดเวลาหลายร้อยปีที่ผ่านมา

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพืชก็เหมือนกับสิ่งที่มีชีวิตทุกชนิดคือมีการเปลี่ยนแปลงทั้งภายนอกตามความเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงภายในหรือทางพันธุกรรมเช่นกันเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป สิ่งนี้จึงเป็นตัวบ่งบอกว่าทำไมการควบคุมโรคและศัตรูพืชชนิดต่างๆ จึงไม่หมดสิ้นไปแม้ว่าจะมีการใช้สารเคมี หรือวิธีการต่างๆอย่างมากมายมาเป็นเวลานานแล้ว ความเสียหายที่เกิดจากโรคชนิดต่างๆ ยังคงพบเห็นเป็นประจำอยู่ทุกปี ตัวอย่างเช่นรายงานขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) พบว่าโดยเฉลี่ยการสูญเสียเมล็ดธัญพืชหลังการเก็บเกี่ยวเพียงอย่างเดียวในประเทศที่กำลังพัฒนาทั่วโลกอยู่ระหว่าง 5 - 30 เปอร์เซ็นต์ แต่เป็นการสูญเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆถึง 4 เปอร์เซ็นต์ (มาลี และวันเชิญ, 2543)

ในประเทศไทยการจัดทำอนุกรมวิธานเชื้อสาเหตุโรคพืชมีรายงานและการจัดทำอยู่บ้างแล้วในอดีต (กรรณิการ์ และ คณะ , 2530; กัญจนา, 2538, 2540; พัฒนา และ คณะ , 2529; วิรัช และ คณะ , 2528; อุบล และ คณะ, 2528) แต่มิได้มีการศึกษา การจัดทำอนุกรมวิธานที่ครอบคลุมทุกกลุ่มพืชหรือทุกสถานที่ที่มีการปลูกพืชของประเทศ และเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคพืชมีอยู่ตลอดเวลาจนเกิดเป็นชนิด(species) สายพันธุ์ (race หรือ biovar)ใหม่ นอกจากนี้ในอดีตมิได้มีการจัดทำอนุกรมวิธานเอกสาร อธิบายลักษณะทางสัณฐานวิทยาครบทั้งเชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส รวมทั้งเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เหล่านี้ไว้เพื่อใช้ประโยชน์อย่างถาวรและเป็นระบบตามมาตรฐานสากลที่ปฏิบัติกันอยู่ทั่วโลก ส่วนมากข้อมูลที่มีอยู่ไม่สมบูรณ์และกระจัดกระจายตามที่ต่างๆทั่วประเทศ หรือมีข้อมูลแต่ขาดสายพันธุ์จุลินทรีย์ผู้ดูแลรับผิดชอบ ขาดบุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญในด้านวิธีและเทคนิคการเก็บรักษา ขาดเครื่องมือและอุปกรณ์หลายอย่างทำให้การเก็บรักษาที่ผ่านมาสูญเสียคุณสมบัติทางพันธุกรรมในเวลาสั้นๆ ทำให้ตัวอย่างสูญเสียความเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อ ในบางแห่งได้สูญหายไปจากแหล่งเก็บหรือมีสภาพที่ไม่สมบูรณ์ ใช้เป็นตัวอย่างศึกษาหรืออ้างอิงมิได้เลย

จากความจำเป็นและเหตุผลดังกล่าว การจัดทำอนุกรมวิธานการเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชที่ถูกวิธีปฏิบัติตามมาตรฐานสากลและการอนุรักษ์อย่างยั่งยืน จึงมีความจำเป็นด้วยเหตุผลและประโยชน์ดังต่อไปนี้

1. เป็นแหล่งรวบรวมเชื้อมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการควบคุมโรคที่มีประสิทธิภาพ ทั้งนี้การวินิจฉัยชื่อสกุลและชนิดที่ถูกต้องเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง
2. ใช้เป็นแหล่งเก็บเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา วิจัยของนักวิชาการ นิสิต นักศึกษาตามสถาบันการศึกษาและบริษัทเอกชนที่สนใจ
3. ใช้เป็นแหล่งเก็บเชื้อมาตรฐานสำหรับงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทั่วไป

4. ใช้เป็นแหล่งเก็บเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการคัดพันธุ์หรือผสมพันธุ์พืชที่ต้านทานโรค
5. ใช้เป็นแหล่งเก็บเชื้อมาตรฐานสำหรับงานวิจัยทางด้านการวิจัยทางอุตสาหกรรมทางการเกษตร เป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มของเชื้อบางชนิด เช่นรา *Fusarium* moniliforme ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุของโรคถอดฝักดาบของข้าว สามารถให้สาร gibberellin ซึ่งสามารถใช้ผลิตเป็นฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตของพืชเป็นอุตสาหกรรมได้
6. เป็นศูนย์เก็บรวบรวมข้อมูล รายละเอียดทางสัณฐานวิทยาและอื่นๆของเชื้อต่างๆ สำหรับประเทศเพื่อให้ทันสมัยและมีมาตรฐานสากลเหมือนประเทศที่เจริญแล้ว
7. เป็นแหล่งเก็บ รวบรวมรายชื่อศัตรูพืช (pest list) สำหรับประเทศในการใช้อ้างอิงกับประเทศอื่นทำให้สามารถวิเคราะห์หา ความเสี่ยงศัตรูพืช หรือ pest risk analysis ในการทำการค้าสินค้าเกษตรกับประเทศต่างๆ ได้

วิธีดำเนินการ

I. **รวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum, Corynespora, Fusarium* และ *Phytophthora* สาเหตุโรคชนิดต่าง ๆของพืชเศรษฐกิจ เชื้อราสกุล *Colletotrichum* และ *Fusarium* บนเมล็ดพันธุ์พืชไร่ และเชื้อราสกุล *Aspergillus* จากผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว**

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรค ใบจุด ใบไหม้ แอนแทรคโนส โรคเหี่ยว โรครากเน่า โรคโคนเน่า โรคแคงเกอร์ และโรคเมล็ดด่าง เป็นต้น
2. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชไร่ เช่นถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด และข้าวฟ่าง
3. ตัวอย่างผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว
   3.1 กลุ่มเครื่องดื่มสมุนไพร
   3.2 ยาสมุนไพร
   3.3 เมล็ดธัญพืช ได้แก่ ข้าวสาร ข้าวเจ้าหอมมะลิ ข้าวกล้อง ข้าวแดงมันปู ข้าวเหนียว ข้าวเหนียวดำ ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และลูกเดือย
   3.4 เมล็ดถั่วต่างๆ
   3.5 ผลิตผลเกษตรที่ใช้ประกอบอาหาร
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar), PCA (potato carrot agar), WA (water agar), PSA (potato sucrose agar), CLA (corn leaf agar), CA (carrot agar), OA (oat agar), BNPRA, BNPRAH, P10 VP และ PVPH
5. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

1.1 การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบจุด ใบไหม้ โรคแอนแทรคโนส โรคเหี่ยว โรครากเน่าโคนเน่า โรคแคงเกอร์ และโรคเมล็ดด่าง ในแหล่งปลูกพืชของประเทศ บันทึกข้อมูลต่างๆ เช่น ชนิดของพืช อายุพืช ลักษณะอาการ ส่วนที่เป็นโรค สถานที่ และสภาพแวดล้อมทั่วไป ถ่ายภาพอาการของโรค

1.2 การเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชไร่

การเก็บตัวอย่างเมล็ดพันธุ์พืชไร่ ได้แก่ เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดข้าวโพด เมล็ดข้าวฟ่าง เมล็ดถั่วเขียว โดยสุ่มเก็บฝักจากแปลงใส่ถุงผ้าหรือเก็บจากยุ้งเกษตรกร โดยสุ่มจากกองและกระสอบใส่ถุงผ้าแล้วจึงนำมาตากให้แห้ง แกะเมล็ดออกจากฝัก

1.3 การเก็บตัวอย่างผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

ทำการเก็บตัวอย่างผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวมาตรวจหาปริมาณและจำแนกชนิดของเชื้อ *Aspergillus* โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เครื่องดื่มสมุนไพร เช่น หญ้าหนวดแมว หญ้าปักกิ่ง หญ้าดอกขาว เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 ยาสมุนไพร ได้แก่ เพชรสังฆาต บอระเพ็ด ขมิ้นชัน เป็นต้น

กลุ่มที่ 3 เมล็ดธัญพืช ได้แก่ ข้าวสาร ข้าวหอมมะลิ ข้าวกล้อง เป็นต้น

กลุ่มที่ 4 เมล็ดถั่วต่างๆ ได้แก่ ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วแดงเมล็ดเล็ก เป็นต้น

กลุ่มที่ 5 ผลิตผลเกษตรที่ใช้ประกอบอาหารในครัวเรือน เช่น พริกแห้งใหญ่ หอมแดง กระเทียม กุ้งแห้ง เครื่องเทศ เป็นต้น

2. การแยกเชื้อและทำเชื้อให้บริสุทธิ์

2.1 การแยกเชื้อราจากพืชที่เป็นโรค

2.1.1 moist chamber method นำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรควางบนกระดาษกรองในจานเลี้ยงเชื้อ เพิ่มความชื้นโดยใส่น้ำกลั่น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 – 2 วัน แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ บันทึกข้อมูลต่างๆ เชื้อราที่เจริญบนเส้นใยสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ โดยใช้เข็มเขี่ยขนาดเล็กที่ปลอดเชื้อ จุ่มลงในวุ้นแล้วแตะสปอร์ 1 สปอร์แล้วนำไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรืออาหารที่เหมาะสมได้ทันที บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. เป็นเวลานาน 7 วัน จึงทำการจำแนกชนิด

2.1.2 tissue transplanting method ตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติให้มีขนาดประมาณ 3 X 3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบนผิวของชิ้นส่วนพืชด้วย chlorox ความเข้มข้น 10 % นาน 3 – 4 นาที แล้วย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อนาน 2 – 3 วัน ที่อุณหภูมิ 26 – 28 °ซ เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการแยกเชื้อเลี้ยงบนอาหาร PDA

จากนั้นทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการแยกสปอร์เดี่ยว (single spore technique) โดยเขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณ 10 spore ต่อ 1 loop ภายใต้เลนซ์ objective กำลังขยาย 10 X จากนั้นใช้ loop ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสปอร์แขวนลอย แล้วนำไป streak บนผิวหน้าอาหาร WA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 – 24 ช.ม. ตักสปอร์เดี่ยวที่งอกย้ายลงเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม ทำการจำแนกชนิดตามขั้นตอนและวิธีการที่ใช้จำแนกของราสกุลนั้น สำหรับตัวอย่างโรครากเน่าโคนเน่า ใบเน่าช้ำซึ่งมีสาเหตุเกิดจากราในสกุล *Phytophthora* ล้างชิ้นส่วนต่างๆของพืชที่เป็นโรคด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร selective media ได้แก่ BNPRA, BNPRAH, P10 VP หรือ PVPH เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ ถ่ายลงเลี้ยงบนอาหาร OA และ CA สำหรับศึกษาโครงสร้างต่างๆ เพื่อจำแนกชนิดต่อไป

2.2 การแยกเชื้อรา *Colletotrichum* และ *Fusarium* จากเมล็ดพันธุ์พืชไร่

สุ่มตัวอย่างเมล็ดที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่างๆ จำนวน 400 เมล็ด นำไปแยกเชื้อด้วยวิธี blotter โดยวางเมล็ดพืชขนาดใหญ่ 10 เมล็ดต่อจาน เมล็ดพืชขนาดเล็ก 20 เมล็ดต่อจานที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำจำนวน 3 แผ่น ใน 1 จาน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน ทำการตรวจเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.3 การแยกเชื้อรา *Aspergillus* จากผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว และหาปริมาณของเชื้อ

นำตัวอย่างที่เป็นผง ผงภายในแคปซูล ชิ้น เม็ด หรือเมล็ด วางบนอาหาร PDA จำนวน 5 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ทำตัวอย่างละ 10 จาน นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 5 – 7 วัน จึงนำมาตรวจหาปริมาณเชื้อรา

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกชนิด

3.1 ราสกุล *Colletotrichum* ใช้วิธีการและเอกสารการจัดจำแนกของ Sutton (1980)

- ศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหาร PDA
- ศึกษารูปร่าง และวัดขนาดของ conidium
- ศึกษาลักษณะรูปร่าง และวัดขนาดของ appresorium บนอาหาร PCA

3.2 ราสกุล *Corynespora* จัดจำแนกชนิดโดยใช้เอกสาร การจัดจำแนกของ Ellis (1971) และ Wei (1952)

- ศึกษาการเกิดของ conidium และลักษณะของ conidiophore
- บันทึกลักษณะรูปร่าง และวัดขนาด conidium

3.3 ราสกุล *Fusarium* จัดจำแนกชนิดตามวิธีการของ Nelson, *et al*. (1983)

- บันทึกการเจริญเติบโต

- บันทึกลักษณะเส้นใยและสีของโคโลนีบนอาหาร PDA ทั้งด้านหน้าและด้านใต้วุ้นอาหารในหลอดเลี้ยงเชื้อ
- บันทึกการสร้าง conidium บนอาหาร CLA
- บันทึกลักษณะรูปร่างของ conidiophore และ conidium
- วัดขนาดของ conidium
- บันทึกการสร้าง chlamydospore บนอาหาร KCL

3.4 ราสกุล *Phytophthora* จัดจำแนกชนิดตามวิธีการของ Waterhouse, (1963); Ribeiro, (1978) และ Newhook, *et al*. (1978)

- ศึกษาลักษณะของ sporangium และวัดขนาด
- ศึกษาการผลิต oogonium, antheridium และ oospore และวัดขนาด

3.5 ราสกุล *Aspergillus*

นำจานอาหารที่บ่มเชื้อแล้วมาจำแนกชนิดของเชื้อที่พบบนแต่ละจุดที่วางตัวอย่างไว้ โดยเปรียบเทียบสีและลักษณะของโคโลนี การสร้าง sclerotium ลักษณะของ head (vesicle) และสปอร์ภายใต้จุลทรรศน์กำลังขยายสูง กับคู่มือที่ใช้ในการจำแนกชนิด *Aspergillus* ชนิดต่างๆ บนแต่ละจุด บันทึกข้อมูลแล้วย้ายเชื้อที่จำแนกชนิดแล้ว เก็บในหลอดอาหาร PDA เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4. การเก็บรักษา

ทำการเก็บรักษา isolate ต่างๆของราทุกสกุลไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ของกองโรคพืชและจุลชีววิทยาด้วยวิธีการต่างๆกัน คือ เก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ OA, PDA เก็บในดิน น้ำกลั่นและกระดาษกรองปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. และ 25-27 °ซ. เก็บไว้ใน กลีเซอรีน 10 % ที่อุณหภูมิ –80 °ซ. และเก็บด้วยวิธีแห้งแข็งสูญญากาศ (freeze drying หรือ lyophilization) isolate ละ 12 หลอด/ขวด นำมาตรวจการมีชีวิตและความเปลี่ยนแปลงทางด้านสัณฐานวิทยาหรือคุณสมบัติอื่นทุก 6 เดือน

II. การตรวจสอบความสามารถของเชื้อ *Aspergillus* ชนิดต่างๆ ในการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินในอาหารเหลว

อุปกรณ์

1. เชื้อ *Aspergillus* ชนิดต่างๆ ที่แยกได้
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, (GY) glucose yeast extract
3. สารเคมี AR Grade: chloroform และ acetone
4. อุปกรณ์ และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. ย้ายเชื้อ *Aspergillus* ชนิดต่างๆ ที่เก็บรวบรวมไว้ วางบนอาหาร PDA ชนิดละ 1 จาน

ด้วยวิธี aseptic technique แล้วนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 º ซ. เป็นเวลา 5 วัน

2. เตรียมอาหารเหลว GY ซึ่งประกอบด้วย 5 % glucose และ 1 % yeast extract ใส่ไว้ในหลอดแก้วในปริมาณ 5 มล.ต่อหลอด เสร็จแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บไว้สำหรับเลี้ยงเชื้อทดสอบ

3. นำจานอาหารที่บ่มเชื้อไว้ออกมาจากตู้บ่มเชื้อ แล้วใช้ cork borer ขนาด 9 มม. เจาะของโคโลนีของเชื้อ จากนั้นย้ายเชื้อ 1 ชิ้นใส่ในหลอดอาหารเหลวที่เตรียมไว้เชื้อละหลอดเป็นด้วยวิธี aseptic technique แล้ว นำหลอดอาหารเหลวทั้งหมดไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 º ซ. เป็นเวลา 3 สัปดาห์

4. หลังจากบ่มเชื้อไว้ 3 สัปดาห์ นำอาหารเหลวแต่ละหลอดมากรองเอาเส้นใยของเชื้อทิ้งไป เก็บอาหารเหลวไว้ในขวด vial แล้วนำมาหยดลงบน TLC (thin layer chromatography) plate โดยใช้ microsyringe ขนาด 10 ไมโครลิตร หยดจำนวน 2 จุดต่อตัวอย่างในปริมาณ 5 ไมโครลิตร และ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ และในแต่ละ TLC plate หยดสารแอฟลาทอกซินมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบด้วย เสร็จแล้วนำ TLC plate มาจุ่มแช่น้ำยา chloroform + acetone (9+1) ในถังแช่น้ำยา (developing tank) เป็นเวลา 45 นาทีก่อนนำ TLC plate ไปตรวจดูความเข้มของแสงภายใต้ UV 365 nm. และวัดปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง TLC scanner และคำนวนหาปริมาณสารพิษที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับสารแอฟลาทอกซินมาตรฐาน

III. ศึกษาชนิด race, ชนิด biovar การตอบสนองต่อปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาและวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเหี่ยวเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย TTC (triphenyl tetrazolium chloride), PSA (potato sucrose agar)
3. สารเคมีชนิดต่างๆ
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
5. โรงเรือนปลูกพืชทดลองและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะปลูก
6. ต้นพืชทดสอบการเกิดโรค

วิธีการ

1. การหาชนิด race และ biovar

1.1 การเก็บตัวอย่างโรคพืช

ทำการเก็บตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจและวัชพืชที่มีลักษณะอาการคล้ายที่เกิดจากแบคทีเรียในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตกและภาคกลางของประเทศไทย นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยา

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างพืชเป็นโรค

ตัดชิ้นส่วนตัวอย่างพืชที่เป็นโรค นำไปแช่ใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ภายในท่อน้ำท่ออาหารไหลออกมาจนน้ำขุ่น จากนั้นทำเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate technique คือนำ loop ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยแล้ว streak บนผิวหน้าอาหาร TTC บ่มที่อุณหภูมิ 30 ซ. นาน 2-3 วัน ย้ายเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะนูน เป็นมันเยิ้ม สีขาวคล้ายน้ำนม ตรงกลางมีสีชมพูลงเลี้ยงในหลอดอาหาร PSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเชื้อจำนวน 2 loop ใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาณ 5 มล. เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องใช้เป็น stock culture สำหรับการศึกษาขั้นต่อไป

1.3 การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบ (hypersensitive reaction, HR-test)

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *R. solanacearum* ปรับความเข้มข้นที่ 10^8 colony forming unit (cfu.) ต่อ มล . โดยเทียบจากการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer, O.D. 0.1 ที่ความถี่ 600 nm. แล้วทำการทดสอบกับใบแก่ของยาสูบพันธุ์ Blight Yellow no.4 โดยฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อ 0.3-0.5 มล.เข้าเนื้อเยื่อใบด้านใต้ใบยาสูบด้วย syringe ขนาด 5 มล. ปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบต่อเชื้อทดสอบมักแสดงให้เห็นเป็นแผลไหม้สีน้ำตาลหรือเป็นจุดสีน้ำตาลภายใน 24-48 ชั่วโมง (+) ถ้ารอยฉ่ำน้ำนั้นเป็นปกติแสดงว่าไม่เกิดปฏิกริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบ (-) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียเชื้อสาเหตุโรคพืชปฏิกิริยาเป็นบวก และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปฏิกิริยาเป็นลบเปรียบเทียบ นำเชื้อที่ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกไปทดสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชต่อไป

1.4 การทดสอบปลูกเชื้อกลับยังพืชที่พบโรค หรือพืชอาศัยอื่นเพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคพืช (pathogenicity test)

ปลูกพืชที่พบโรคในดินนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อต้นพืชอายุได้ 2-3 สัปดาห์ ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่แยกได้ ชนิดรุนแรงบนอาหาร TTC แล้วจิ้มแทงเนื้อเยื่อของลำต้นใกล้ผิวดิน ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ ตรวจผลการเกิดโรคของต้นพืชทดสอบ

1.5 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่น เพื่อจำแนกชนิด race

ทำการทดสอบกับพืชอาศัยอื่น (collateral hosts) จำนวน 7 ชนิดได้แก่ มันฝรั่ง (พันธุ์ May queen), มะเขือเทศ (พันธุ์ LS. 89), ถั่วลิสง (พันธุ์ Chiba hanryu หรือ Nakadate), ยาสูบ (พันธุ์ Bright yellow no.4), พริก (พันธุ์ Wase green), มะเขือยาว (พันธุ์ Senryu 2 gou) และขิง (พันธุ์ Roscoe) การปลูกเชื้อใช้วิธีการเดียวกันกับ 1.4 ตรวจผลการเกิดโรคโดยการให้คะแนนในการเป็นโรค (disease rating) ตามาตรฐานของศูนย์วิจัยมันฝรั่งนานาชาติดังนี้ 0=ไม่เกิดโรค, 1= 1-2 ใบล่างแสดงอาการเหลืองหรือเหี่ยว, 2= 3-4 ใบล่างแสดงอาการเหลืองหรือเหี่ยว, 3=ครึ่งต้นแสดงอาการเหลืองหรือ

เหี่ยว, 4= ¾ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว และ 5 = ทั้งต้นแสดงอาการเหี่ยวหรือตาย แล้วจำแนกชนิด race ตามความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบดังกล่าว

1.6 การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิด biovar

ทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีตามหลักการของ Hayward, 1964 และ 1991 เพื่อทดสอบปฏิกิริยาการสร้างกรดจากน้ำตาลคาร์โบไฮเดรต 6 ชนิด ได้แก่ maltose, lactose, cellobiose, mannitol, sorbitol และ dulcitol ที่ผสมในอาหารพื้นฐาน (basal media) ที่ไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ โดยมีน้ำตาล D-glucose เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกและไม่มีน้ำตาลเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ โดยใช้เข็มเขี่ยแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละ isolate ที่เจริญบนอาหาร TTC 2-3 วัน แทงตั้งฉากตรงใจกลางของอาหารแล้วเททับผิวหน้าด้วยอาหารวุ้นผง 5 % เก็บไว้ที่ 28-30 °ซ. ตรวจสอบปฏิกิริยาการสร้างกรดหลังถ่ายเชื้อแล้ว 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ถ้าเกิดการสร้างกรดสีอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทองซึ่งอ่านผลของปฏิกิริยาเป็นบวก (+) แต่ถ้าไม่สร้างกรด สีอาหารจะไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนสีเล็กน้อยแต่ยังคงเป็นสีเขียวอยู่ซึ่งอ่านผลของปฏิกิริยาเป็นลบ (-) การจำแนกชนิดของ biovar ตามปฏิกิริยาการสร้างกรดมาตรฐาน

2. การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum*

ตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยต่างๆ 17 ชนิด ที่ได้จากข้อ 1. ด้วยแอนติซีรัมของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่ง ทำการทดสอบด้วย indirect ELISA ดังนี้

2.1 การเตรียมเชื้อ

เตรียมสารละลายเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชต่างๆ ตามหัวข้อ 1.3 โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^8 cfu. ต่อ มล . ปริมาตร 4.5 มล. ผสมด้วยสารละลาย coating buffer (carbonate buffer) ชนิด 10 X ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดใส่ในหลุมของจานอีไลซ่าชนิดโพลิซอร์ปขนาด 96 หลุม โดยในตัวอย่างละ 2 หลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้ 37 °ซ. นาน 4 ชม. หรือทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4 °ซ.

2.2 การล้าง

นำจานอีไลซ่ามาล้างด้วย PBS-T โดยใส่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุมแล้วล้างด้วยเครื่องล้าง Mini washing Danatech laboratory Inc, USA ทำ 3 ครั้งแต่ละครั้งใช้เวลา 30 วินาที แล้วคว่ำเคาะจานอีไลซ่าบนกระดาษสะอาดหลายๆ ครั้ง

2.3 การทำ blocking

โดยนำมาทำกับชุดตรวจสอบแบบสำเร็จเรียกว่า ABC-kit เริ่มด้วยการบล๊อกด้วย blocking buffer 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37 °ซ. นาน 60 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น

2.4 การใส่ primary antiserum

นำจานอีไลซ่าจากข้อ 2.3 มาใส่ primary antiserum ของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง โดยเจือจาง primary antiserum ให้ได้ความเข้มข้นเดียวกับที่ได้จากการหาค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม โดยใส่ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37 °ซ. นาน 1-2 ชม. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีการล้างที่กล่าวข้างต้น

2.5 การใส่ secondary antiserum

นำจานอีไลซ่าจากข้อ 2.4 มาใส่ secondary antiserum ซึ่งเป็น IgG conjugate with biotin ที่อยู่ในชุดสำเร็จปริมาตร 1 หยดต่อ PBS 15 มล. แล้วดูดปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุม แล้วบ่มที่ 37 °ซ. นาน 45 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร APH ที่อยู่ในชุดสำเร็จดังกล่าวปริมาตร 1 หยดต่อหลุมแล้วบ่มที่ 37 °ซ. นาน 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T อีกครั้งหนึ่ง

2.6 การทำให้เกิดสี

นำจานอีไลซ่าจากข้อ 2.5 ใส่ด้วยสาร p-nitrophenyl phosphate ที่มีมาในชุดสำเร็จดังกล่าวด้วยปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37 °ซ. หรือเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารในหลุมที่เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองทองซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที

2.7 การหยุดปฏิกิริยา

หยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วย 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) ซึ่งมีอยู่ในชุดสำเร็จดังกล่าวโดยใส่ทุกหลุมด้วยปริมาตร 1 หยดต่อหลุม

2.8 การอ่านค่าปฏิกิริยา

นำจานอีไลซ่าจากข้อ 2.7 มาอ่านค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่า ตั้งค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร มีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็น homologous immunogen และมีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบเป็น น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ , carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer, BSA และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น *Erwinia carotovora* pv. *carotovora, Agrobacterium tumefaciens*, และ *Xanthomonas campresits* เป็นต้น

นำค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่เกิดกับเชื้อ *R. solsnacearum* ของแต่ละ isolate ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่นๆ มาเปรียบเทียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวก

3. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum*

ทำการทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum* โดยการคัดเลือกตัวแทนของ race และ biovar ของพืชอาศัยบางชนิดมาทำการศึกษา 3 กรรมวิธีด้วยกันคือ

กรรมวิธีที่ 1 ใส่เชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว 2 ลูปต่อหลอด

กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงเชื้อบนอาหารเอียง PDA ชนิดหน้าแคบ แล้วเททับด้วย mineral oil ปลอดเชื้อ

กรรมวิธีที่ 3 เก็บโดยวิธี freeze-dry โดยละลายเชื้อด้วย skim milk แบ่งใส่ในหลอด ampule จำนวน 150 ไมโครลิตร ทำให้แห้งแข็ง สูญญากาศด้วยเครื่อง lyophilizer

นำหลอดทดลองทั้งหมดไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 °, 10 – 14 ° และ 30 °ซ. ตรวจการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อทุก 1 เดือน

IV. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PSA (Potato Sucrose Agar)
3. สารเคมีชนิดต่างๆ
4. เครื่องมือและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ
5. โรงเรือนปลูกพืชและอุปกรณ์ในการเพาะปลูก

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* จากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทย

2. การแยกเชื้อสาเหตุ

ตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนที่เป็นโรคกับส่วนปกติเป็นชิ้นสี่เหลี่ยม ขนาด 3 X 3 มม. ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ในแอลกอฮอล ความเข้มข้น 70 % เป็นเวลา 5 นาที ล้างในน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง จึงนำไปบดในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อ แล้วบดให้ละเอียด ทำเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยโดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำ suspension มา streak ลงบนอาหาร PSA บ่มที่อุณหภูมิ 28 ° ซ. นาน 3-4 วัน คัดเลือกโคโลนีสีเหลือง ลักษณะเป็นเลื่อมมัน นูน ขอบเรียบ ย้ายลงบนอาหาร PSA แล้วทำเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อไว้ภายใต้น้ำมัน (paraffin oil) และในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

3. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์

นำเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ที่รวบรวมได้เลี้ยงบนอาหาร PSA นาน 36-48 ชม. ทำการจำแนกชนิดของแกรม (gram reaction) โดยใช้ด่าง 3 % ตามวิธี KOH Solubility test จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและฟิสิกส์ เช่น Oxidation-Fermentation test, Hydrolysis of Arginine เป็นต้น บางปฏิกิริยา ใช้วิธีการตาม Schaad method บันทึกผลการทดลอง เปรียบเทียบคุณสมบัติกับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* จากต่างประเทศ คือประเทศญี่ปุ่น และอาร์เจนตินา

4. การปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

นำใบพืชทดสอบ 4 ชนิด ได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน มะกรูด และส้มโอ ล้างผิวใบด้วย NaOCL 1 % นาน 1-2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2-3 ครั้ง คว่ำใบลงบนอาหาร WA 1% ในจานเลี้ยงเชื้อ ปลูกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทุก isolate โดยใช้กลุ่มเข็มจำนวน 10 เล่ม สะกิดผิวใบระหว่างเส้นใบให้เกิดแผล แล้วหยดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียลงบนแผล ทำแผล 2 จุดต่อใบ ได้ 20 แผล ทำจำนวน 2 ใบต่อพืชแต่ละชนิด ปิดจานเลี้ยงเชื้อด้วยเทปใสเพื่อไม่ให้ใบแห้ง นำใบบ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28 ºซ. และมีแสงสว่าง เป็นเวลา 7-14 วัน ตรวจผลการเกิดโรค หากแสดงอาการเป็นโรคจะมีขุยสีขาวขึ้นจากผิวใบ บริเวณที่ปลูกเชื้อไว้

5. การแบ่งกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ตามการใช้น้ำตาล

นำเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ที่แยกได้ เลี้ยงบนอาหาร PSA นาน 36-48 ชม. จากนั้นนำไปทดสอบการใช้น้ำตาล (utilization of cabohydrates) ตามวิธีการของ Schaad ตรวจผล 7, 14 และ 21 วัน โดยตรวจการเปลี่ยนสีของอาหาร ซึ่งสี Bromthymol blue ในอาหารเป็น indicator นำผลที่ได้มาจัดกลุ่มเชื้อชนิดนี้ตามการใช้น้ำตาล ถ้ามีการใช้ในน้ำตาลและสร้างกรดสีอาหารจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองส้ม

6. การเก็บรักษาเชื้อ

เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย isolate ต่างๆ ที่บริสุทธิ์ไว้ภายใต้น้ำมัน (paraffin oil) และในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ isolate ละ 24 vial แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 14 ºซ. ทำการตรวจการมีชีวิตอยู่รอดและตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อทุก 3 เดือน

ผลการทดลองและวิจารณ์

I. รวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum, Corynespora, Fusarium* และ *Phytophthora* สาเหตุโรคชนิดต่าง ๆของพืชเศรษฐกิจ เชื้อราสกุล *Colletotrichum* และ *Fusarium* บนเมล็ดพันธุ์พืชไร่ และเชื้อราสกุล *Aspergillus* จากผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว

1. ผลการรวบรวมและจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Colletotrichum, Corynespora, Fusarium* และ *Phytophthora* สาเหตุโรคพืชชนิดต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจ จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทยระหว่างเดือน ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546 พบว่า รวบรวมตัวอย่างได้ทั้งหมด 849 ตัวอย่าง แยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ 413 isolate รวบรวมเมล็ดพันธุ์พืชไร่ได้ 125 ตัวอย่าง แยกเชื้อรา *Colletotrichum* และ *Fusarium* ได้ 43 Isolate รวบรวมผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวได้ 464 ตัวอย่าง แยกเชื้อ *Aspergillus* ได้ 314 isolate จำแนกชนิดได้ดังนี้

<u>กลุ่มโรคพืช</u> แยกเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสได้ 110 isolate จำแนกได้ 5 ชนิด ได้แก่ *C. acutatum* จากพริกและสตรอเบอรี่ *C. capsici* จากพริกและมะละกอ *C. circinans* จากหอมแบ่ง *C.gloeosporioides* จากฝรั่ง มะละกอ ชมพู่ มะม่วง สตรอเบอรี่ อโวกาโด องุ่น กาแฟ ยางพารา

มะขามเทศ หอมชนิดต่างๆ กุยช่าย พริกไทย หน่อไม้ฝรั่ง พริก หน้าวัว ดาหลา และกุหลาบ และ *C. truncatum* จากถั่วเหลืองและถั่วแดงหลวง แยกราสกุล *Corynespora* สาเหตุโรคใบจุดได้ 92 isolate จำแนกได้ 2 ชนิด ได้แก่ *C. cassiicola* จากถั่วเหลือง มะเขือเทศ ยางพารา งา ฝ้าย ถั่วแขก ถั่วเขียวผิวดำ ถั่วหรั่ง มะละกอ ฟัก สะระแหน่ กะเพราะ ผักบุ้ง ระย่อม ทานตะวัน ไฮแดรนเยีย คริสมาส และเล็บครุฑ และ *C. elacidicola* จากหวายน้ำ แยกราสกุล *Fusarium* ได้ 88 isolate จำแนกได้ 7 ชนิด 8 form species ได้แก่ *F. graminearum* จากข้าวสาลีเป็นโรค scab *F.moniliforme* จากข้าวโพดเป็นโรคลำต้นเน่า *F. oxysporum* f.sp. *cubense* จากโรคตายพรายของกล้วย *F.oxysporum* f.sp. *gladioli* จากโรคหัวเน่าของแกลดิโอลัส *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* จากโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* จากโรคเหี่ยวของถั่วลันเตา *F.oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* จากโรคเหี่ยวของถั่วฝักยาว *F. oxysporum vasinfectrum* จากโรคเหี่ยวของฝ้าย *F. oxysporum* f.sp. *zingiberi* จากโรคเหี่ยวของขิง *F. prolifratum* จากโรถถอดฝักดาบของข้าว และเอื้องพร้าว *F.semitectum* จากโรคเมล็ดด่างของข้าว และ *F. solani* จากโรคเร่งตายของถั่วเหลือง และโรค black spot ของหัวมันฝรั่งแยกราสกุล *Phytophthora* ได้ 123 isolate จำแนกชนิดได้ 6 ชนิด ได้แก่ *P. botryosa* จากโรคใบร่วงและหน้ากรีดโรคใบร่วงและเส้นดำของยางพารา *P.cinnamomi* จากโรครากเน่าของ อโวกาโด ชมพู่ทูลเกล้า ส้มเขียวหวานและแอสเตอร์ *P.colocasiae* จากโรคใบไหม้ของเผือก P. infestans จากโรคใบไหม้ของมันฝรั่งและมะเขือเทศ *P.palmivora* จากโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน มะละกอ ลองกอง หน้าวัว กล้วยไม้ วานิลา เฟื่องฟ้า มะพร้าว มะม่วง *Alocasia senderiana, Dieffenbachia daguense* และโบตั๋น และ *P.parasitica* จากโรครากเน่า ใบไหม้และผลเน่าของพริกไทย ส้ม มะนาว มะกรูด แพชชั่นฟรุท สตรอเบอรี่ สับปะรด มะเขือเทศ (ตารางที่ 1-3, ภาพที่ 1-8)

เชื้อราสกุล *Colletotrichum* ทุก species ที่ได้จัดจำแนกและอธิบายลักษณะ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับที่ Sutton (1980)ได้จำแนกไว้ แต่ขนาดของ conidium ของเชื้อบางชนิดมีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย ชนิดที่มีพืชอาศัยจำนวนมากและเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด คือ *C. gloesporioides* สอดคล้องกับรายงานของ Holiday (1980) และ วิรัช และ คณะ (2528) ก่อความเสียหายทุกส่วนของลำต้น หากทำความเสียหายที่ผล ทำให้การส่งออกผลไม้ไปต่างประเทศมีอุปสรรค เช่น มะม่วง ฝรั่ง เป็นต้น ราชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแปรปรวนมากทั้งในสภาพบนพืชอาศัยและอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนมากรูปร่างและขนาดของ conidium และลักษณะโคโลนีรวมทั้งปริมาณการสร้างสปอร์ค่อนข้างแตกต่างกันระหว่าง isolate

เชื้อรา *Corynespora cassiicola* เป็นอีกชนิดหนึ่งที่มีพืชอาศัยกว้างมากเช่นกัน สามารถทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชมากกว่า 80 ชนิด (Chee, 1980 a) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่เข้าทำลายพืชอาศัยต่างชนิดกันมักคงที่ แต่แปรปรวนเมื่อสภาพความชื้นเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะรูปร่างและขนาดของ conidium ตรงกับรายงานของ พัฒนา และ ลักษณ์, 2534

ราสกุล *Fusarium* เป็นราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแปรปรวนสูง ค่อนข้างยุ่งยาก ทำให้ระบบการจัดจำแนกมีจำนวนมาก ผู้ต้องการศึกษาทางด้านนี้ควรยึดระบบใดระบบหนึ่ง *F. graminearum* เป็นชนิดที่ค่อนข้างคงที่มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่นซึ่งสอดคล้องกับ Nelson, *et al*. (1983) ส่วน *F.oxysporum* มี form-species จำนวนมาก การจำแนกมักใช้พืชอาศัยเป็นตัวบ่งชี้ (Booth, 1971)

ราสกุล *Phytopthora* จัดเป็นราที่มีบทบาทสำคัญทางด้านโรคพืชมากที่สุด นอกจากมีพืชอาศัยที่สำคัญทางเศรษฐกิจจำนวนมากแล้ว ยังเข้าทำลายระบบรากและโคนต้นของไม้ผลขนาดใหญ่ ทำให้ต้นโทรมหรือตายไป เช่น ทุเรียน เป็นต้น การแยกเชื้อต้องใช้อาหารและวิธีการจำเพาะ จึงได้เชื้อที่บริสุทธิ์ การจำแนกนอกจากใช้ลักษณะทางความแตกต่างของ sporangium บางครั้งต้องศึกษาความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิในระดับสูงที่ 35 ºซ. ด้วยตามที่ อุบล และคณะ (2528) ได้ทำการศึกษาไว้

<u>กลุ่มพืชผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว</u> แยกราสกุล *Colletotrichum* และ *Fusarium* จากเมล็ดพันธุ์พืชไร่ ได้ 43 isolate จำแนก *Colletotrichum* ได้ 1 ชนิด คือ *C. truncatum* จากเมล็ดถั่วเหลือง จำแนก *Fusarium* ได้ 4 ชนิด ได้แก่ *F.monili*forme จากเมล็ดถั่วเหลืองและเมล็ดข้าวโพด *F.oxysporum* จากเมล็ดถั่วเหลืองและเมล็ดถั่วเขียว *F.semitectum* จากเมล็ดถั่วเหลือง และ *F.solani* จากเมล็ดถั่วเหลือง (ตารางที่ 1) แยกราสกุล *Aspergillus* ได้ 314 isolate จำแนกได้ 10 ชนิด 1 variety ได้แก่ *A.flavus, A.flavus var.volummaris, A.tamarii, A.niger, A.aculeatus, A.fumigatus, A.terrcus, A.glaucus, A.parasiticus, A.nidulans* และ *A.clavatus* ซึ่งพบการปนเปื้อนมากในข้าวกล้อง ข้าวแดง ข้าวมันปู ข้าวเหนียวดำ ลูกเดือย ถั่วลิสง เมล็ดมะม่วงหิมพานต์ ผลิตผลเกษตรในครัวทุกชนิดยกเว้นเครื่องเทศ

F. moniliforme บนเมล็ดถั่วเหลือง ถั่วเขียว และข้าวฟ่าง ไม่ค่อยพบมากนัก แต่พบมากบนเมล็ดข้าวโพด และสร้างสารพิษ fumonisin B ได้ในระดับสูง *F. semitectum* จัดเป็นพวกราฉวยโอกาส พบเสมอบนเมล็ดพืชและต้นพืชทั่วไป ทางด้านโรคพืชเป็นสาเหตุโรคเมล็ดด่างของข้าวโดยเกิดร่วมกับเชื้อราชนิดอื่นอีก 3 ชนิด (นิรนาม, 2543) หรือก่อให้เกิดโรคผลเน่า ขั้วผลเน่าของกล้วย (สุภา, 2536)

2. ผลการรวบรวมและจำแนกชนิดราสกุล *Aspergillus* จากผลิตผลเกษตร และตรวจหาปริมาณการปนเปื้อน

กลุ่มที่ 1 เครื่องดื่มสมุนไพร 23 ชนิด จำนวน 268 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* 125 ตัวอย่าง จำแนกได้ 9 ชนิด ในพืชสมุนไพรทุกชนิดยกเว้นกระเจี๊ยบแดง เป็น *A. niger* 4-64 %, *A. flavus* 2-58 %, *A. aculeatus* 2-17 % และ *A. tamarii* 2-12 % ส่วน *A. fumigaus, A. terreus, A. glaucus, A. parasiticus* และ *A. nidulans* ในปริมาณ 2-8 %

กลุ่มที่ 2 ยาสมุนไพร 18 ชนิด จำนวน 108 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* 33 ตัวอย่าง จำแนกได้ 8 ชนิด คือ *A. niger* ปริมาณ 4-54 %, *A. glaucus* 2-38 % *A.aculeatus* 2-21 %, *A. tamarii* 2-12 % ส่วน *A. fumigatus, A. glaucus, A. nidulans และ A. terreus* พบปริมาณ 2-12 % จากยาสมุนไพร บางชนิดไม่พบการปนเปื้อนในส้มแขกสกัดและคาลมาโก

กลุ่มที่ 3 เมล็ดธัญพืช 9 ชนิด 27 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* 20 ตัวอย่าง โดยพบมากในข้าวกล้อง ข้าวแดงมันปู ข้าวเหนียวดำ และเดือย จำแนกได้ 7 ชนิด คือ *A. flavus* ปริมาณ 2-45 % *A. niger* 2-38 %, *A. tamarii* และ *A.aculeatus* ปริมาณ 2-8 % สำหรับ *A. terreus, A. glaucus* และ *A. fumigatus* จาก ข้าวเหนียว และลูกเดือย พบปริมาณเล็กน้อย

กลุ่มที่ 4 เมล็ดถั่ว 8 ชนิด จำนวน 38 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Aspergillus* ในทุกตัวอย่าง จำแนกได้ 8 ชนิด คือ *A. niger* พบ 2-56 % *A. flavus* 2-46 % *A. tamarii* 1-12 % *A. aculeatus* 1-8 % *A. clavatus A. glaucus, A. flavus* var. *volumaris* และ *A. terreus* ปริมาณ 2-8 %

กลุ่มที่ 5 ผลิตผลเกษตรที่ใช้ในครัวเรือน 8 ชนิด 23 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* ในทุกตัวอย่างยกเว้นเครื่องเทศจำนวน 4 ตัวอย่าง จำแนกได้ 5 ชนิดคือ *A. niger* 4-45 %, *A. flavus* 2-46%, *A. aculeatus* 2-8 %, *A. tamarii* 2-4 % และ *A. glaucus* 2%

II. ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Aspergillus* ชนิดต่าง ๆ ในการสร้างสารแอฟลาทอกซิน

ผลการทดสอบ *Aspergillus* 11 ชนิด จำนวน 314 isolate พบว่า มีเพียง 2 ชนิดที่สร้างแอฟลาทอกซินในอาหารเหลวได้ คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดย *A.flavus* จำนวน 76 ใน 151 isolate สามารถสร้างสารพิษได้ คิดเป็น 50.3 % มีปริมาณ 0.1-99.2 mg/kg สำหรับ *A. parasiticus* จำนวน 1 isolate สามารถสร้างสารพิษได้ปริมาณ 18 mg/kg.

การตรวจสอบผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว พบการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* spp.เกือบทุกชนิด ทั้งเครื่องดื่มสมุนไพร ยาสมุนไพร ที่นิยมรับประทานเพื่อสุขภาพ รวมทั้งผลิตผลเกษตรที่ใช้ในครัวเรือน แต่ชนิดที่พบว่าสามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินมีเพียง 2 ชนิดคือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* แม้ว่าชนิดอื่นไม่สร้างสารพิษแต่ก็ควรหลีกเลี่ยงการบริโภคเนื่องจาก สปอร์มีผลต่อระบบทางเดินหายใจ ทำให้เกิดโรคปอด (Alexpoulos and Mims, 1979)

III. ศึกษาชนิด race, ชนิด biovar, การตอบสนองต่อปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาและวิธีการเก็บรักษา *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย

1. การหาชนิด race และ biovar

1.1 ผลการเก็บตัวอย่าง

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียของพืชชนิดต่างๆ จาก 21 จังหวัด ได้จำนวน 250 ตัวอย่างในพืช 18 ชนิด เป็นพืชเศรษฐกิจ 17 ชนิด วัชพืช 1 ชนิด คือ หน้าวัว กะเพรา พริกขี้หนู ปทุมมา มะเขือยาว ยูคาลิปตัส ขิง ถั่วลิสง ดาวเรือง พริกชี้ฟ้า พริกเหลือง มันฝรั่ง งา ยาสูบ มะเขือเทศ มะเขือเปราะ ผักบุ้ง และหญ้ายาง

1.2 ผลการแยกเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างพืชเป็นโรค

สามารถแยกได้ 115 isolate จากพืช 18 ชนิด

1.3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองเฉียบพลันของยาสูบ

พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืชต่างๆ ทั้ง 115 ไอโซเลท แสดงผลการตอบสนองอย่างเฉียบพลัน เป็นบวก กล่าวคือทุกเชื้อที่ใช้ทดสอบสามารถทำให้เกิดรอยแผลไหม้สีน้ำตาลบนใบยาสูบ ยกเว้นเชื้อที่แยกจากยาสูบ ให้ผลการตอบสนองเป็นลบ

1.4 ผลการทดสอบการปลูกเชื้อกลับไปยังพืชที่พบโรคหรือพืชอาศัยอื่น

พบว่าทุก isolate ให้ผลเป็นบวก กล่าวคือสามารถทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับพืชเดิมที่พบโรคและพืชอาศัยอื่นที่นำมาทดสอบ

1.5 ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่น เพื่อจำแนกชนิด race

พบว่าเชื้อที่ใช้ทดสอบจำนวน 115 ไอโซเลท กับพืชอาศัย 7 ชนิด สามารถจำแนกชนิดของ race ได้ 2 race คือ race 1 และ race 3 (ตารางที่ 9) ได้ดังนี้

race 1 ได้แก่	หน้าวัว	4 ไอโซเลท
	กะเพรา	1 ไอโซเลท
	พริกขี้หนู	4 ไอโซเลท
	ปทุมมา	6 ไอโซเลท
	มะเขือยาว	6 ไอโซเลท
	ยูคาลิปตัส	1 ไอโซเลท
	ขิง	10 ไอโซเลท
	ถั่วลิสง	7 ไอโซเลท
	ดาวเรือง	4 ไอโซเลท
	พริกเหลือง	2 ไอโซเลท
	พริกชี้ฟ้า	9 ไอโซเลท
	มันฝรั่ง	8 ไอโซเลท
	งา	2 ไอโซเลท
	ยาสูบ	6 ไอโซเลท
	มะเขือเทศ	6 ไอโซเลท
	มะเขือเปราะ	7 ไอโซเลท
	ผักบุ้ง	2 ไอโซเลท
	หญ้ายาง	3 ไอโซเลท

race 3 ได้แก่	พริกขี้หนู	1	ไอโซเลท
	พริกซี้ฟ้า	1	ไอโซเลท
	มันฝรั่ง	7	ไอโซเลท

1.6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิด biovar

จากการทดสอบปฏิกิริยาการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ สามารถจำแนกชนิดของ biovar ของเชื้อ *R. solanacearum* จากพืช 18 ชนิดได้ 3 biovar ได้แก่ biovar 2 biovar 3 และ biovar 4 ดังนี้

biovar 2	ได้แก่	พริกขี้หนู	1 ไอโซเลท
		พริกซี้ฟ้า	1 ไอโซเลท
		มันฝรั่ง	7 ไอโซเลท
biovar 3	ได้แก่	หน้าวัว	4 ไอโซเลท
		กะเพรา	1 ไอโซเลท
		พริกขี้หนู	4 ไอโซเลท
		ปทุมมา	2 ไอโซเลท
		ยูคาลิปตัส	1 ไอโซเลท
		ขิง	4 ไอโซเลท
		ถั่วลิสง	1 ไอโซเลท
		ดาวเรือง	4 ไอโซเลท
		พริกขี้หนู	2 ไอโซเลท
		พริกซี้ฟ้า	2 ไอโซเลท
		มันฝรั่ง	3 ไอโซเลท
		งา	2 ไอโซเลท
		ยาสูบ	5 ไอโซเลท
		มะเขือเทศ	6 ไอโซเลท
		มะเขือเปราะ	3 ไอโซเลท
		หญ้ายาง	3 ไอโซเลท
biovar 4	ได้แก่	ปทุมมา	4 ไอโซเลท
		มะเขือยาว	5 ไอโซเลท
		ขิง	6 ไอโซเลท
		ถั่วลิสง	6 ไอโซเลท
		ดาวเรือง	1 ไอโซเลท

พริกชี้ฟ้า	7 ไอโซเลท
มันฝรั่ง	24 ไอโซเลท
มะเขือเปราะ	4 ไอโซเลท
ผักบุ้ง	2 ไอโซเลท

2. การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum*

ผลการตรวจสอบพบว่า แอนติซีรัม จากมันฝรั่งสามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific reaction) ระดับสูง ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคนี้กับมะเขือเทศ มะเขือยาว พริกขี้หนู พริกเหลือง พริกชี้ฟ้า ยาสูบ งา และผักบุ้ง สามารถอ่านค่า OD ของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ELISA reader ได้ > 1.5, เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับกลาง (moderate reaction) ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืช หน้าวัว, กะเพรา, ปทุมมา, ขิง, มะเขือเปราะ, ถั่วลิสง และดาวเรือง สามารถอ่านค่าของปฏิกิริยาได้ระหว่าง 0.6-1.5 และเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับอ่อน (weak reaction) กับเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชยูคาลิปตัสและวัชพืชหญ้ายาง สามารถอ่านค่า OD ของปฏิกิริยาได้ < 0.6 (ตารางที่ 10)

3.* การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum

ผลการทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อชนิดนี้ จำนวน 7 ไอโซเลท เกิดกับพืชอาศัย 5 ชนิด ครอบคลุม 2 ชนิด race และ 3 ชนิด biovar ได้แก่ มันฝรั่ง race 1 biovar 3 มันฝรั่ง race 1 biovar 4 มันฝรั่ง race 3 biovar 2 พริก race 1 biovar 3 มะเขือเทศ race 1 biovar 4 และขิง race 1 biovar 3 พบว่าการเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บแบบ freeze-dry สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้เกิน 2 ปีครึ่ง และคงมีคุณสมบัติเช่นเดิม สำหรับการเก็บภายใต้น้ำมันแร่ เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน 17-27 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของ race และ biovar

ในการศึกษาการจำแนกชนิด race พบว่า เชื้อ *R. solanacearum* จากพืชชนิดหนึ่งสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชอื่นๆได้ ดังนั้นเชื้อนี้จึงสามารถมีชีวิตอยู่รอดในดินหรือพืชอาศัยได้ตลอดฤดูปลูกโดยเฉพาะ race 1 ส่วน race 3 ที่พบในพริกไม่เคยมีรายงานมาก่อน คาดว่าอาจติดมากับหัวมันฝรั่งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

IV. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่น

1. ผลการเก็บรวบรวมตัวอย่างและแยกเชื้อโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *citri* สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างได้ 287 ตัวอย่าง แยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ ได้ทั้งหมด 125 เชื้อ (ไอโซเลท)

2. **ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ** ***X. campestris*** pv. ***citri*** ต่อพืชตระกูลส้ม 4 ชนิด สามารถแบ่งความรุนแรงของเชื้อ (pathogenic strain) คือ 6 กลุ่ม (ตารางที่ 11) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้มทั้ง 4 ชนิด คือมะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน มี 100 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด และส้มโอ แต่ไม่เป็นโรคกับส้มเขียวหวาน มี 22 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว มะกรูด แต่ไม่เป็นโรคกับส้มโอ ส้มเขียวหวาน มี 2 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน แต่ไม่เป็นโรคกับมะกรูด มี 23 ไอโซเลท

ในการทดสอบความรุนแรงบนพืชทดสอบพืช 4 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน พบว่าส้มเขียวหวาน ส้มโอ และมะกรูด จะมีความต้านทานต่อ เชื้อบางไอโซเลท ในการแบ่งกลุ่ม (strain) ของเชื้อทั้งหมด 152 ไอโซเลท พบว่า กลุ่ม 1 เป็นกลุ่มที่เกิดโรคกับส้มทั้ง 4 ชนิด ที่ทดสอบมีจำนวนถึง 100 ไอโซเลท คิดเป็นเปอร์เซ็นได้ 68 % ซึ่งเป็นกลุ่มที่ระบาดมากที่สุดในประเทศไทย และสามารถเกิดขึ้นกับพืชตระกูลส้มทุกชนิดหลายแห่ง

3. **คุณสมบัติทางชีวเคมี** จากผลการทดลองศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี ของเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ทั้ง 152 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้ง 152 ไอโซเลท เป็น Gram negative ไม่สร้าง spore มีหาง (flagellation) หางเดียว มีการใช้ oxygen (oxydation) สามารถย่อยแป้ง (starch) ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย casein สร้างเอนไซม์ lecithinase ได้ ไม่ใช้ arginine และ gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอ็นไซม์ urease เกิดก๊าซ Hydrogen sulphide (H_2S) สร้าง Acetoin เกิด proteolysis ใน Litmus milk (peptonization) สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 36 ^{o}ซ. สามารถทนทานต่อเกลือ NaCL ได้ตั้งแต่ 3 %, 5 % ถึง 7 % บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอ็นไซม์ tyroinase แต่บางสายพันธุ์ไม่สร้าง ซึ่งเป็นส่วนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* จากประเทศญี่ปุ่น และอาร์เจนตินา พบว่า ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเหมือนกัน ส่วนมากมีเพียงการทนทานต่อเกลือ NaCL เท่านั้นที่แตกต่าง โดยในสายพันธุ์ที่มาจากญี่ปุ่นและอาร์เจนตินาทนทานต่อเกลือ NaCL ได้เพียง 3 % แต่สายพันธุ์ของประเทศไทยทนทานได้ถึง 7 % (ตารางที่ 12)

4. **การแบ่งกลุ่มเชื้อ** ***X. campestris*** pv. ***citri*** **โดยการใช้น้ำตาล** จากการศึกษาการใช้น้ำตาลของเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ทั้ง 152 ไอโซเลท พบว่า สามารถใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, treehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, starch, malonate, citrate, succinate และ malate แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลพวก L-methyl, D-glocoside, raffinose, inositol, inulin, dulcitol, gluconate, oxalate, acetate

และ tartrate (ตารางที่ 13) และพบว่าเกิดความแตกต่างใน 3 น้ำตาล คือ rhamnose, sorbitol และ salicin แตกต่างกันระหว่างไอโซเลท ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตามการใช้น้ำตาล 4 กลุ่ม ดังนี้ (ตารางที่ 14-15)

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และ salicin มี 23 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และ salicin มี 44 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่ทั้งสองน้ำตาล มี 25 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ทั้งสองน้ำตาล มี 60 ไอโซเลท

โดยกลุ่มที่ 4 พบมากที่สุดถึง 40 % รองลงมาคือ กลุ่มที่ 2 มี 29 % กลุ่มที่มีน้อยที่สุดได้แก่ กลุ่มที่ 1 มี 15 % จากการใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นของ rhamnose, sorbitol และ salicin ส่วนใหญ่พบว่าปฏิกิริยาเหล่านั้นจะเกิดการสร้างด่าง (alkali production) โดยพบอาหารน้ำตาลที่ใช้เปลี่ยนจากสีเดิมจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ในปฏิกิริยาในน้ำตาลชนิดอื่นๆ พบว่ามีการสร้างกรด (acid production) โดยอาหารน้ำตาล สีเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง-ส้ม ซึ่งทั้งการสร้างกรดและด่างที่เกิดขึ้น ก็เกิดเนื่องมาจากมีการใช้น้ำตาลนั้นเอง

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนก ชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum, Corynespora, Fusarium* และ *Phytophthora* สาเหตุโรคชนิดต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจ เชื้อราสกุล *Colletotrichum* และ *Fusarium* บนเมล็ดพันธุ์พืชไร่ และราสกุล *Aspergillus* จากผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวสามารถจำแนกรา *Colletotrichum* ได้ 5 ชนิด *Corynespora* 2 ชนิด *Fusarium* 7 ชนิด 8 form species *Phythphthora* 6 ชนิด และ *Aspergillus* 10 ชนิด 1 variety

2. ผลการทดสอบความสามารถของเชื้อต่อการสร้างสารพิษในอาหารเหลว พบ *A. flavus* และ *A. parasiticus* สร้างแอฟลาทอกซิน ได้ปริมาณ 0.1-99.2 mm/kg และ 18 mg/kg ตามลำดับ

3. ผลการจำแนกชนิด race และ biovar ของเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจและวัชพืช พบว่าจากตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืช 18 ชนิด 115 ไอโซเลท สามารถแยกชนิด race ได้ 2 race คือ

race 1 ได้แก่ หน้าวัว กะเพรา พริกขี้หนู ปทุมมา มะเขือยาว ยูคาลิปตัส ขิง ถั่วลิสง ดาวเรือง พริกเหลือง พริกชี้ฟ้า มันฝรั่ง งา ยาสูบ มะเขือเทศ มะเขือเปราะ ผักบุ้ง และหญ้ายาง

race 3 ได้แก่ พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า และมันฝรั่ง

แยกชนิด biovar ได้ 3 biovar คือ

biovar 2 ได้แก่ พริกขี้หนู พริกชี้ฟ้า มันฝรั่ง

biovar 3 ได้แก่ หน้าวัว พริกชี้ฟ้า หญ้ายาง

biovar 4 ได้แก่ ปทุมมา พริกชี้ฟ้า ผักบุ้ง

4. ผลการรวบรวมสายพันธุ์และอนุกรมวิธานแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม แยกเชื้อได้ทั้งหมด 152 ไอโซเลท มีคุณสมบัติเป็น Gram negative ไม่สร้างสปอร์มีหาง 1 หาง มีการใช้ oxygen สามารถย่อยแป้ง, gelatin, Tween 80 และ casein สร้างเอนไซน์ urease เกิดแก๊ส H_2S สร้างสาร acetoin สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36 °ซ. ทนทานต่อเกลือ NaCl ตั้งแต่ 3 – 7 % สามารถแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลได้ 4 กลุ่ม และแบ่งตามความรุนแรงของเชื้อในการทำให้เกิดโรคได้ 4 กลุ่ม

5. ผลการศึกษาวิธีการเก็บรักษาราและแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช 7 สกุล 2 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus, Colletotrichum, Corynespora, Fusarium, Phytophthora, R. solanacerum* และ *X. campestris* pv. *citri* พบว่าในระยะ 2 ปี 6 เดือน วิธีการเก็บแบบ แห้งแข็งสูญญากาศ (freeze-dry) เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการเก็บรักษารา *Aspergillus, Colletotrichum, Fusarium* และ*R. solanacerum* ส่วนรา *Corynespora* คงสภาพการมีชีวิตและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนเดิมด้วยการเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. รา *Phytophthora* เก็บได้ดีในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหรือเลี้ยงบนอาหาร OA แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 25-27 °ซ. สำหรับแบคทีเรีย *R. solanacearum* และ *X.campestris* pv. *citri* เก็บได้ดีในน้ำกลั่นน้ำมันแร่หรือน้ำมันพาราฟินนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4-14 °ซ. แต่การเก็บ *R. solanacearum* ภายใต้น้ำมันพาราฟิน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เชื้อมีชีวิตอยู่ได้ระหว่าง 17-27 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของ race และ biovar

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์ กัญจนา โป๊ะเงิน อุบล คือประโคน และวิรัช ชูบำรุง. 2530. โรคมะละกอที่เกิดจากเชื้อรา *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. หน้า 7-16. ใน : รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2530 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

กัญจนา พุทธสมัย ประวัติ ตันบุญเอก และวรเดช ทองธรรมชาติ. 2540. เชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวฟ่างและการป้องกันกำจัด. หน้า 21-30 ใน : รายงานผลงานวิจัย ปี พ.ศ. 2540 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

กัญจนา พุทธสมัย รัตตา อเนกธนโชติ และวรเดช ทองธรรมชาติ. 2538. ศึกษาการระบาดของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดถั่วเหลืองในภาคเหนือ. รายงานผลงานวิจัย, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นิรนาม. 2543. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 49 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน และ ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ. 2534. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชนิดพืชอาศัยของ *Corynespora cassiicola* สาเหตุโรคใบจุดก้างปลาของยางพารา. วารสารยางพารา 11(2) : 81-99.

มาลี สุวรรณอัตถ์ และ วันเชิญ โพธาเจริญ. 2543. แบคทีเรียและยีสต์ : การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์. หน้า 203-218. ใน : บทความปริทัศน์งานวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย.โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย. Work Press Printing, กรุงเทพฯ.

วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และพัฒนา สนธิรัตน. 2528. ศึกษาเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ในประเทศไทย, หน้า. 128-136. ใน : รายงานผลงานวิจัย กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สุภา สุขเกษม. 2536. โรคหลังเก็บเกี่ยวของกล้วย. ข่าวสารโรคพืช 3(4) : 7-8.

อุบล คือประโคน สมศักดิ์ เสียงก้อง และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2528. เชื้อรา *Phytophthora* ชนิดต่างๆ ในประเทศไทย . การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 23, 4-7 กุมภาพันธ์ 2528. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. (ไม่มีเลขหน้า)

Alexopoulos, C. J. and C. W. Mims. 1979. Introductory Mycology. 3 rd edition. John Wiley and Sons, New York. 632 pp.

Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Eastern Press Limited, London. 237 pp.

Chee, K. H. 1988 a. Studies on sporulation, pathogenicity and epidemiology of *Corynespora cassiicola* on Hevea rubber. *Journal of Natural Rubber Research* 3: 21-29.

Ellis, M B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 608 pp.

Hayward, A. C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. App. Bacteriology 27:265-277.

Hayward, A. C. 1991. Biological and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Ann. Rev. Phytopathology 26: 65-87.

Holiday, P. 1980. Fungus diseases of tropical crops. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 607 pp.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species – an illustrated manual for identiification. The Pennsylvania State University Press, University Park, London. 193 pp.

Newhook, F.J., G. M. Waterhouse and D. J. Stamps. 1978. Tabular keys to the species

of *Phytophthora* de Bary. Mycological papers no. 43. 20 pp.

Ribeiro, O.K. 1978. A Sourcebook of the Genus *Phytophthora* . Strauss and Cramer GmbH, Girschberg ll. 417 pp.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2 nd. Ed. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. 320 pp.

Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. Mycological papers no. 92. 22 pp.

Wei, C. H. 1950. Notes on *Corynespora*. Mycological papers no. 34. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 10 pp.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes fungi imperfecti with pycnidia , acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey. 695 p.

การจำแนกรา *Rhizoctonia* สาเหตุโรคพืช

Identification of *Rhizoctonia* Plant Pathogenic Fungi

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แยกรา *Rhizoctonia* จากพืช 8 ชนิดได้แก่ ขมิ้น กาแฟ สละ ทุเรียน ข้าว ฝ้าย ลำไย และกวางตุ้ง จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2545 - กันยายน 2546 โดยวิธี Tissue Transplanting Direct Isolation และ Baiting technique สามารถรวบรวมรา *Rhizoctonia* ได้จำนวน 39 สายพันธุ์ (isolate) จำแนกชนิดได้ 2 สกุล (genera) 4 ชนิด (species) ได้แก่ *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia* sp. 1, *Rhizoctonia* sp. 2 และ *Ceratobasidium noxium* รา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จาก ข้าว ทุเรียน ลำไย สละ ฝ้าย กวางตุ้ง และกาแฟ สายพันธุ์ RZ 008 จังหวัดสุราษฎร์ธานี และ กาแฟ สายพันธุ์ RZ 007 จังหวัดเชียงใหม่ จำแนกชนิดเป็น *Rhizoctonia solani* ซึ่งมีนิวเคลียสหลายนิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (multinucleate) สำหรับ *Rhizoctonia* ซึ่งแยกได้จากกาแฟพันธุ์อาราบิก้า จังหวัดเชียงใหม่ สายพันธุ์ที่ RZ 003, RZ 004, RZ 005 และ RZ 006 จำแนกชนิดเป็น *Ceratobasidium noxium* ซึ่งมีจำนวนนิวเคลียส 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (binucleate) นอกจากนั้นยังพบรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากสละ และขมิ้น สายพันธุ์ RZ 014 และ RZ 001 มีลักษณะนิวเคลียสเป็น binucleate และจำแนกได้เป็น *Rhizoctonia* sp. 1 และ *Rhizoctonia* sp. 2

เส้นใยรา *R. solani* และ *C. noxium* เจริญได้ดีบนอาหาร OMA, V-8, PYDA และ PDA และจากการทดลองครั้งนี้พบว่าเชื้อราทั้ง 2 ไม่สร้างระยะ teleomorphic state บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ เก็บรักษาราเหล่านี้ไว้บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และเก็บเชื้อบน PDA แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลว จะสามารถเก็บราไว้ได้นาน 6 เดือน และ 12 เดือน เพื่อการอนุรักษ์และการศึกษารานี้ต่อไป

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 46 11 009 001

คำนำ

Rhizoctonia solani เป็นราที่พบโดยทั่วไป เ ป็น parasite ของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเข้าทำลายส่วนของราก และลำต้นที่อยู่ใต้ดิน รา *Rhizoctonia solani* มีพืชอาศัยกว้างมาก ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ดและต้นกล้าที่ยังไม่โผล่ขึ้นเหนือดิน stem canker รากเน่า ผลเน่าและโรคที่ใบ (Parmeter and Whitney, 1970)

Ogoshi (1996) ได้กล่าวว่าในระหว่างปี ค.ศ. 1815-1900 De Candall ได้เริ่มต้น ศึกษาราสกุล *Rhizoctonia* และบรรยายลักษณะของราสกุลนี้และกำหนดรา *Rhizoctonia crocorum* (Pers.) DC เป็น type species ต่อมาในปี 1858 Khün แต่รา *Rhizoctonia. solani* เป็นราที่มีความสำคัญที่สุดในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งถูกตั้งชื่อขึ้นโดย Khün ในปี 1858 ได้รายงานลักษณะของรา *Rhizoctonia. solani* ว่าเป็น species ที่มีความสำคัญทางด้านโรคพืชเนื่องจากเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญของพืชหลายชนิด ซึ่งมีการศึกษาทางด้านการเกิดโรค การจำแนกชนิด นิเวศน์วิทยา และการควบคุมโรคพืช (Ogoshi, 1996)

การศึกษารา *Rhizoctonia* ระหว่างปี ค.ศ. 1901-1930 Matsumoto, *et al.* (1932) ศึกษาทางด้านสรีรวิทยาของรา *Rhizoctonia* และทำการเปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของราชนิดนี้หลาย สายพันธุ์ ต่อมา Bernard (1909) เป็นบุคคลแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ โดยศึกษาการแยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้และจำแนกชนิดเป็นราในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งไมคอร์ไรซาเจริญอยู่กับรากกล้วยไม้โดยเมล็ดกล้วยไม้ได้รับธาตุอาหารและพลังงานจากรา ราน้ีจะช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมากทำให้กล้วยไม้บางชนิดงอกยากมาก รา *Rhizoctonia* จะ ช่วยในการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

ในระหว่างปี ค.ศ.1931-1940 เริ่มมีการศึกษาศึกษาเกี่ยวกับ anastomosis ของรา *Rhizoctonia* โดยทำการผสมกันระหว่างเส้นใยชนิดเดียวกัน ก็จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยในการจัดจำแนกชนิดราในสกุลนี้

การศึกษารา *Rhizoctonia* ในะหว่างปี ค.ศ. 1941-1950 น้อยลงมาก เนื่องจากเกิดสงครามโลกครั้งที่ 2

ต่อมา ปี ค.ศ. 1951-1960 มีการศึกษาทางด้าน anastomosis ของรา *Rhizoctonia solani* กันมากขึ้น เช่นการศึกษาของ Richter และ Schneider (1953) และ Ito และคณะ . (1955) เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีการศึกษาและการชักนำรา *Rhizoctonia solani* ให้สร้าง teleomorphic states โดย รวมทั้งมีการศึกษานิเวศวิทยาของรา *Rhizoctonia* ในดินด้วย เนื่องจากการศึกษา และพัฒนาวิธีการแยกรา *Rhizoctonia* จากดิน จากพืชที่เป็นโรค และ ชนิดของรา *Rhizoctonia* saprophyte ที่อยู่ในดิน ตลอดจนการศึกษาปริมาณความหนาแน่นของราในดินจะมีอิทธิพลต่อการระบาดของโรค ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานในการป้องกันกำจัดและควบคุมโรคได้

Parmeter และ Whitney (1970) ศึกษารา *Rhizoctonia solani* และได้บรรยายลักษณะของราไว้ดังนี้ 1) เส้นใยของรามีสีน้ำตาล 2) เส้นใยแตกแขนงที่บริเวณใกล้ septum บริเวณใกล้จุดแตกแขนงใน young vegetative hypha แขนง 3) การแตกแขนงมีลักษณะเป็นมุมฉาก และมี septum กั้นบริเวณใกล้จุดที่แตกแขนง 4) เส้นใยของราเป็น dolipore septa 5) มีหลายนิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (multinucleate) ใน young vegetative hypha 6) ราสร้าง monilioid cells และสร้าง sclerotia เส้นใยมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 μm อัตราการเจริญเติบโตเร็ว และมีความสามารถทำให้เกิดโรค แต่มีลักษณะบางอย่างที่ไม่พบในราชนิดนี้ ได้แก่ ไม่พบ clamp connection ไม่สร้าง conidium หรือสปอร์ รา ไม่สร้าง rhizomorph และส่วนใหญ่มีสีน้ำตาลเท่านั้น นอกจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในการจัดจำแนกชนิดแล้วยังพบว่ารา *Rhizoctonia* spp. แต่ละชนิดมี teleomorphic state ที่แตกต่างกันด้วย ถ้าทราบระยะ teleomorphic state ของรา *Rhizoctonia* จะทำให้ทราบชนิดของรา *Rhizoctonia*

เนื่องจากรา *Rhizoctonia solani* มีความแปรปรวนสูงทั้งลักษณะทางกายภาพและสรีรวิทยา ตลอดจนความสามารถในการทำให้เกิดโรค ซึ่งทำให้เกิดการสับสนและการขัดแย้งมา เป็นเวลาหลายปี จากการที่เส้นใยของรา *R. solani* มีจำนวนนิวเคลียสหลายอันต่อหนึ่งเซลล์ (multinucleate) ทำให้มีการศึกษากันมากในเรื่องของปรากฏการของการแบ่งตัวของนิวเคลียส การเคลื่อนย้ายของนิวเคลียส และ การแลกเปลี่ยนนิวเคลียสโดยวิธี anastomosis ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับพื้นฐานทางสรีรวิทยา นิเวศวิทยา และพันธุกรรมของเชื้อในการทำให้เกิดโรค โดยมีการศึกษากลไกของ การสร้างสารปฏิชีวนะ ปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ในดิน พฤติกรรมของนิวเคลียสใน ราที่เป็น multinucleate เส้นใย anastomosis และ โครงสร้างภายในเซลล์ของรา โดยเฉพาะโครงสร้างของรูเปิดตรงผนังกั้น (septal pore) ตลอดจนการสร้างเอ็นไซม์ของเชื้อราในการทำให้เกิดโรค และการศึกษาชีวเคมีสำหรับพืชอาศัยที่ต้านทานเชื้อรา (Parmeter *et al*., 1965; Parmeter และ Whitney 1970; Sneh *et al*., 1991, 1996)

Rhizoctonia solani Khün จัดอยู่ใน

Sub-division Deuteromycetes

Order Agonomycetales

Family Agonomycetaceae

รา *Rhizoctonia* มีลักษณะสำคัญคือไม่สร้าง สปอร์ สร้างแต่เส้นใยและ resistant structure ที่เรียกว่า microsclerotium หรือ sclerotium ซึ่งเกิดจากการพันตัวของเส้นใย หรือเส้นใยประสานกันอย่างหลวม ๆ หรือ moniloiod อย่างหลวม ๆ มีรายงานว่ารา *Rhizoctonia solani* มี teleomorphic state คือ *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donks ซึ่งจัดอยู่ใน subdivision Basidiomycotina (Sneh *et al*., 1991)

Ogoshi (1975) ได้กำหนดลักษณะของ *R. solani* ไว้ดังนี้ 1) เส้นใยแตกแขนงใกล้บริเวณ septum

กั้นบริเวณใกล้จุดแตกแขนงใน young vegetative hypha แขนง 2) เส้นใยแตกแขนงออกเป็นมุมฉาก และมีผนังกั้นเซลล์บริเวณใกล้จุดที่แตกแขนง 3) เส้นใยเป็น dolipore septa โดยมีรู (septal pore) อยู่ที่ตรงกลาง 4) ไม่สร้าง clamp connection 5) ไม่มีการสร้าง conidia และ rhizomorph ราสร้าง sclerotium เป็นเส้นใยที่พันกันอย่างหลวม ๆ sclerotium ของรา *Rhizoctonia solani* จะต่างกับรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งจะมีเนื้อเยื่อรอบนอก (rind) และคอร์เท็กซ์เป็น psudoparenchyma ส่วนชั้นในสุด (medulla) เป็นเส้นใย อย่างไรก็ตาม ลักษณะโดยทั่วไปของรา *Rhizoctonia* ความแตกต่างของสีเส้นใย จำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์ใน young vegetative และลักษณะทางกายภาพของ teleomorph stage และระยะ teleomorph ของ *Rhizoctonia* จะเป็นลักษณะที่ใช้ในการจำแนกชนิดของราในสกุลนี้

Moore (1987) ได้รวบรวม ข้อมูลในการจำแนกชนิดของรา *Rhizoctonia* และ *Rhizoctonia*-like fungi โดยใช้ลักษณะของ septal pore และ ระยะ teleomorphic state เป็นเกณฑ์ และได้ จัดจำแนกรากลุ่ม *Rhizoctonia* อยู่ใน class ต่าง ๆ คือ ascomycetes, ustomycetes, holobasidiomycetes และ heterobasidiomycetes โดยใช้ลักษณะของผนังกั้นเซลล์ของราแต่ละชนิดที่แตกต่างกันในการจัดจำแนก รา class ascomycetes ผนังกั้นหรือ septum นั้น ไม่ปิดทึบหมด แต่มีช่องหรือรูเปิดตรงกลาง รา class Basidiomycetes มีลักษณะที่เรียกว่า dolipore septum โดยมีรูอยู่ที่ตรงกลางแผ่น septal plate และที่รอบ ๆ รูมีส่วนโป่งเรียกว่า septal swelling ส่วนที่เป็นรูหรือ septal pore นี้ถูกล้อมรอยด้วยแผ่น endoplasmic reticulum เป็นวงโค้งและมีช่องเปิดเป็นรูเล็ก ๆ เรียกว่า parenthesomes ราในกลุ่ม Ustomycetes มี ผนังกั้นเซลล์แบบง่าย ๆ และ มีช่องเปิดเป็นรูเล็ก ๆ มีลักษณะเป็นแบบ perforate parenthesome ส่วนราที่จัดในกลุ่ม Heterobasidiomycetes มี รู septal pore อยู่ที่ตรงกลางมีลักษณะค่อนข้างจะซับซ้อน เป็นแบบ imperforate parenthesome ไม่มีรูเปิด (Moore, 1985, 1996)

ระยะ Anamorphic state ของราสกุล *Rhizoctonia* เป็น heterogenous รา *Rhizoctonia crocorum* (Pers.) DC: Fr. เป็น anamorph ของรา *Helicobasidium brebisonii* (Desm.) Donk (= *H. purpureum*) simple pored basidiomycetes-type septum แตกต่างจาก doriporous species เนื่องจากมี 5S ribosomal RNA sequence ที่ต่างกัน (Walker and Doolittle, 1983)

Moore (1985) ได้แทนที่ anamorphic state ของรา *Thanatephorus* spp. เป็น *Moniliopsis* Ruhland ซึ่งแต่เดิม anamorphic state ของรากลุ่มนี้คือ *Rhizoctonia solani* เขาได้แทนที่ muitinucleate *Rhizoctonia* สำหรับ anamorphic state ของรากลุ่ม ustomycetous ซึ่งมีผนังกั้นเซลล์แบบง่าย ๆ และมีช่องเปิดเป็นรูเล็ก ๆ เป็นรา *Moniliopsis* ซึ่งมีเส้นใยมีผนังกว้าง เรียบ และสีน้ำตาล เป็น multinucleate cells, dolipore septa เป็นแบบ perforate parenthesomes และ teleomorphic state ของราชนิดนี้คือ *Thanatephorus* และ รา *Waitea* ส่วน binucleate *Rhizoctonia* spp. ที่มีจำนวนนิวเคลียส 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ Moore ได้ กำหนดรา *Rhizoctonia repens* Bernard ซึ่งมีระยะ telemorphic state เป็น *Tulasnella deliquescens* (Juel) Juel. และ

เปลี่ยนชื่อรา *Rhizoctonia repens* เป็น *Epulorhiza repens* หมายความว่ารา *Rhizoctonia* ที่มีระยะ telemorphic state เป็น *Tulasnella* จะมีชื่อว่า *Epulorhiza* และมี *Rhizoctonia repens* เป็น type species และรา *Rhizoctonia* ที่มีระยะ telemorphic state เป็น *Ceratobasidium* ให้เปลี่ยนชื่อ *Rhizoctonia* เป็น *Ceratorhiza* (Moore, 1987)

ระบบของ Moore เป็นอนุกรมวิธานที่ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับโดยสามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่าง *Rhizoctonia crocorum* (type species) และ *Rhizoctonia solani* และ related fungi อย่างไรก็ตามก็ยังมีข้อโต้เถียงของนักโรคพืชวิทยาเกี่ยวกับชื่อของ *Rhizoctonia* ซึ่งยังเป็นที่สับสนอยู่ ดังนั้นสำหรับ monograph นี้ ยังคงใช้ชื่อ *Rhizoctonia* ตามระบบของ Moore คือ *Moniliopsis* spp., *Ceratorhiza* spp. และ *Epulorhiza* spp. (Sneh et al., 1991, 1996)

การเก็บรักษาสายพันธุ์รา *Rhizoctonia* นั้นส่วนใหญ่เก็บเชื้อไว้บน slant agar ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนย้ายอาหารทุก 4-5 เดือน เพื่อให้รายังคงมีชีวิตอยู่ แต่เนื่องจากมีการเปลี่ยนย้ายอาหารหลายครั้งอาจจะทำให้พันธุกรรมของเชื้อเปลี่ยนแปลง และความรุนแรงของโรคลดลง (Butler, 1980) ดังนั้นจึงมีการศึกษาการเก็บรักษารา *Rhizoctonia* ให้ยาวนาน (มากกว่า 6 เดือน) เช่น Butler (1980) ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อราให้มีชีวิตอยู่นาน โดยเก็บรักษาเชื้อไว้ในดินผสมกับข้าวสาลีที่ปั่นละเอียด (Soil Wheat-Bran Method) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –25 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีนี้ยังคงสภาพความรุนแรงของเชื้อไว้ได้และมีอายุอย่างน้อย 10 ปี และยังสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์รา *Rhizoctonia* บน dried cereal grain เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต หรือข้าวสาลี โดยแช่เมล็ดให้เปียกตลอดทั้งคืน ในน้ำผสมสารฆ่าเชื้อ Chloramphenicol 250 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาปั่นให้ละเอียดผสมกับดิน และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ติดต่อกัน 2 วัน จากนั้นนำเมล็ดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาใส่ในขวด vial ปิดด้วย screw cap ให้แน่น และนำมานึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากใส่เชื้อแล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –25 องศาเซลเซียส (Sneh *et al*., 1991)

นอกจาก นี้วิธีการเก็บรักษารา *Rhizoctonia* ไว้ได้นานโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า –139 องศาเซลเซียส หรือเก็บโดยวิธี Cryogenic storage ซึ่งเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส หรือเก็บภายใต้ไอไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ซึ่งวิธีเหล่านี้จะสามารถเก็บรักษารา *Rhizoctonia* ไว้ได้นานมาก Smith and Onions (1994) ศึกษาการเก็บรักษารา *Thanatephorus cucumeris* โดยวิธี Cryogenic method พบว่ารานี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้อย่างน้อย 12 ปี

การจัดจำแนกชนิดโดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดเป็นงานพื้นฐานที่สำคัญ ในการแบ่งแยกชนิด (species) ของรา *Rhizoctonia* หลักของการจัดจำแนกชนิดใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ สีและขนาดของเส้นใย สีและลักษณะของ culture จำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์ ลักษณะเซลล์

วิทยา ลักษณะของ hyphal anastomosis รูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ teleomorph state ลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสิ่งสำคัญในการจัดจำแนกชนิดของรา งานทางอนุกรมวิธานนี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานทางด้านนิเวศวิทยา และการระบาดของเชื้อรา *Rhizoctonia* spp. ในปัจจุบันได้มีการศึกษาทางด้านชีวเคมี (biochemical) และทางอณูชีววิทยา (molecular technique) วิทยาการทั้ง 2 ด้านนี้มีประโยชน์ต่องานทางด้านการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ เพราะสามารถตรวจสอบพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะความเหมือนหรือต่างของพันธุกรรมเป็นการจำแนกชนิดของรา และความสัมพันธ์ของ ทางด้านชีวเคมีและอณูชีวโมเลกุลสามารถใช้ตรวจสอบลักษณะทางด้าน anastomosis group ได้

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจรวบรวมรา *Rhizoctonia* ที่เป็นสาเหตุโรคพืชในประเทศไทย และจัดจำแนกชนิดราสกุล *Rhizoctonia* ที่รวบรวมได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เปรียบเทียบการเจริญของราบนอาหารชนิดต่าง ๆ ตลอดจนการชักนำให้ราสร้างระยะ telemorphic state เพื่อช่วยในการจัดจำแนกชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ส่วนของพืชที่เป็นโรคได้แก่ ใบ ลำต้น กิ่ง ผล โคนต้น ต้นกล้า และราก จากพืช 8 ชนิด ได้แก่ ขมิ้น กาแฟ สละ ทุเรียน ข้าว ฝ้าย ลำไย และกวางตุ้ง
2. เมล็ดข้าวเปลือก
3. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ: สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลอลกอฮอล์ 75% ; สีย้อม : safranin – o และ KOH
4. อาหารวุ้นสังเคราะห์ potato dextrose agar (PDA), corn meal agar (CMA), V8 juice agar, marmite yeast extract, water agar (WA) เป็นต้น
5. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (LM) และ Stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายภาพ
6. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการได้แก่ เครื่องแก้ว กระบอกพลาสติก กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. และกระดาษกรอง (Whatman #2) เป็นต้น

วิธีการ

1. สำรวจรวบรวม และศึกษาโรคพืชที่เกิดจากรา *Rhizoctonia*

สำรวจเก็บตัวอย่างโรคพืชที่แสดงอาการโรคใบไหม้ ใบติด กาบใบแห้ง โคนเน่า ผลเน่า และต้นกล้าเน่าจากจังหวัดเชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี จันทบุรี สุพรรณบุรี ระยอง ตราด ชุมพร นครราชสีมา และปทุมธานี บันทึกรายละเอียดลักษณะอาการ ของโรค และห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกรายละเอียดชนิดพืช สถานที่ และวันที่เก็บ บรรจุห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำการแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกรา *Rhizoctonia* จากส่วนที่เป็นโรค (Isolation technique)

2.1 การแยกเชื้อราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช (Direct Isolation)

แยกเชื้อสาเหตุจากผลสละเน่า (ตารางที่ 2) โดยแกะเปลือกผลสละออก จะพบเส้นใยราสีน้ำตาลของ *Rhizoctonia* ที่เจริญอยู่ภายในผล และใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมเขี่ยเส้นใยราวาง บนอาหาร Corn Meal Agar (CMA) และ Water Agar (WA) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมา วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) วางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของราต่อไป

2.2 การแยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplanting

แยกเชื้อจากโรคลำต้นเน่าของขมิ้น โรคเน่าดำของกาแฟ โรคใบติดของทุเรียน และลำไย และโรคกาบใบเน่าของข้าว และโรคลำต้นเน่าของกวางตุ้ง (ตารางที่ 2) ตัดตัวอย่างโรคพืชบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) แล้วบ่มไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

2.3 การแยกราจากดินโดยวิธีใช้เหยื่อล่อ (Baiting Technique)

แยกเชื้อจากต้นกล้าฝ้ายทีเป็นโรคโคนเน่า (ตารางที่ 2) เก็บตัวอย่างดินบริเวณต้นกล้าฝ้ายที่เป็นโรคโคนต้นเน่า บรรจุใส่ลงในแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ฝังเมล็ดข้าวเปลือกที่นึ่งฆ่าเชื้อลงในดินประมาณ 10 เมล็ดต่อ 1 แก้ว บ่มไว้ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำเมล็ดข้าวเปลือกมาล้างน้ำให้สะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองและนำมาวางบนอาหาร Corn Meal Agar (CMA) บ่มไว้ ในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูเส้นใยราที่เจริญออกมารอบเมล็ดข้าวเปลือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากเมล็ดข้าวเปลือก วางลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

3. การจำแนกรา *Rhizoctonia*

นำรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากวิธีต่าง ๆ จากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

3.1 ลักษณะของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ด sclerotium

3.2 ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Rhizoctonia* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ light microscope โดยการ mount สไลด์ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหรือ Shear's solution ศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของ monilioid cell ขอราที่เจริญบนอาหารและถ่ายภาพราจากกล้องจุลทรรศน์แบบ compound นำลักษณะของราดังกล่าวเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา *Rhizoctonia* (Moore, 1987; Sneh *et al.,* 1991; Roberts, 1999)

3.3 ศึกษาจำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์โดยการย้อมสีด้วย Safranin O (Bandoni, 1979) เลี้ยงรา *Rhizoctonia* ชนิดต่าง ๆ บนอาหาร PDA, ½ PDA และ V8 agar นาน 1-2 วัน การทำสไลด์โดยหยดสี safranin-o ลงบนสไลด์ 1 หยด และหยด 3% KOH ลงบน safranin -o 1 หยด แล้วเขี่ยปลายเส้นใยของราวางในหยดสีบนสไลด์ และปิดด้วย cover slip และนำไปตรวจดูจำนวนนิวเคลียส ใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกจำนวนนิวเคลียสที่พบในแต่ละเชื้อ และถ่ายภาพราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4. การศึกษาสรีรวิทยาของเชื้อรา

4.1 ทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบ ติดทุเรียน

วางแผนการทดลอง แบบ CRD มี 10 ซ้ำ 8 กรรมวิธี โดยใช้อาหารแต่ละชนิดเป็นแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 Potato dextrose agar (PDA)

กรรมวิธีที่ 2 Potatato dextrose yeast agar (PDYA)

กรรมวิธีที่ 3 V8 juice agar (V-8)

กรรมวิธีที่ 4 Oat meal agar (OMA)

กรรมวิธีที่ 5 Corn meal agar (CMA)

กรรมวิธีที่ 6 Czapek's agar (CZA)

กรรมวิธีที่ 7 Malt extract agar (MEA)

กรรมวิธีที่ 8 Water agar (WA)

วิธีการทดลอง

เทอาหารแต่ละชนิดในแต่ละกรรมวิธีลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบติดทุเรียนที่เตรียมไว้ นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส

การวัดผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยของราบนอาหารแต่ละชนิดเมื่อเส้นใยเชื้อราบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำผลมาวิเคราะห์ทางสถิติ

4.2 ทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Ceratobasidium noxium* สาเหตุ โรคเน่าดำของกาแฟ

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบติดทุเรียน ข้อ 4.1

5. การชักนำเชื้อรา *R. solani* ให้สร้าง teleomorph state ดำเนินการ 2 วิธี คือ

5.1 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ย้ายราจากอาหารที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ไปยังอาหารที่ไม่มีธาตุอาหาร (Papavizas, 1965) เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA + 1 g/L yeast extract นาน 4 –6 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตัด hyphal tip ของเชื้อราวางลงบนอาหาร soil extract agar บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 22-23 องศาเซลเซียส ตรวจดูการสร้าง teleomorph state ภายใต้กล้องจุลทัศน์

5.2 เลี้ยงราบนอาหาร marmite (Murray, 1982; 1985)

เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร OPDMA (potato extract 15.0 g, marmite yeast extract 40 g, dextrose 7.5 g, agar 20 g, distilled water 1000 ml, pH 5.2) และ อาหาร ODMA (marmite 25 g, dextrose 12.5 g, , distilled water 1000 ml, pH 5.2) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตัด hyphal tip ของเชื้อราวางลงอาหาร tap water บ่มไว้ใต้แสง เป็นเวลา 7-12 วัน ตรวจดูการสร้าง teleomorph state ภายใต้กล้องจุลทัศน์

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

สถานที่ แปลงเกษตรกร

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลา 1 ปี เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2545

สิ้นสุดเดือนกันยายน 2546

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคพืชที่เกิดจากรา *Rhizoctonia*

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรค ของพืช 8 ชนิด จาก จังหวัดเชียงใหม่ สุราษฎร์ธานี จันทบุรี สุพรรณบุรี ระยอง ตราด ชุมพร นครราชสีมา และปทุมธานี แยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการได้รา *Rhizoctonia* 39 สายพันธุ์ (isolate) (ตารางที่ 1) ดังนี้

โรคลำต้นเน่าของขมิ้นจากจังหวัด จันทบุรี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ RZ 001, RZ 002

โรคเน่าดำของกาแฟจากจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ RZ 003, RZ 004, RZ 005, RZ 006 และ RZ 007

โรคเน่าดำของกาแฟจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ RZ 008

โรคทะลายเน่าของสละจากจังหวัดจันทบุรี ตราด และปทุมธานี จำนวน 8 สายพันธุ์ คือ RZ 009, RZ 010, RZ 011, RZ 012, RZ 013, RZ 014, RZ 015 และ RZ 016

โรคใบติดของทุเรียนจากจังหวัดจันทบุรี ชุมพร ระยอง และตราด จำนวน 14 สายพันธุ์ RZ 017, RZ 018, RZ 019, RZ 020, RZ 021, RZ 022, RZ 023, RZ 024, RZ 025, RZ 026, RZ 027, RZ 028, RZ 029 และ RZ 030

โรคกาบใบแห้งของข้าวจากจังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ RZ 031, RZ 032 และ RZ 033

โรคโคนต้นเน่าของฝ้ายจากจังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ RZ 034

โรคใบติดของลำไยจาก อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ RZ 035

โรคใบติดของลำไยจาก อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ RZ 036

โรคลำต้นเน่าของกวางตุ้งจากจังหวัดนราธิวาส จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ RZ 037, RZ 038 และ RZ 039

2. การจำแนกชนิดลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Rhizoctonia*

2.1 การจำแนกชนิดของรา *Rhizoctonia*

จากการศึกษาสามารถแยกรา *Rhizoctonia* จากพืชอาศัย 8 ชนิด ได้ 39 สายพันธุ์ จำแนกชนิดเป็นรา *Rhizoctonia* 2 สกุล (genera) 4 ชนิด (species)

รา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จาก โรคกาบใบแห้งของข้าว จากจังหวัดสุพรรณบุรี โรคใบติดของทุเรียนจากจังหวัดจันทบุรี ระยอง ตราด และชุมพร โรคใบติดของ ลำไยจากจังหวัดเชียงใหม่ โรคผลเน่าของสละจากจังหวัดจันทบุรี ตราด และปทุมธานี โรคโคนเน่าของฝ้ายจากจังหวัดนครราชสีมา โรค ลำต้นเน่าของกวางตุ้งจากจังหวัดนราธิวาส และโรคเน่าดำของกาแฟโรบัสต้า isolate RZ 008 จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี และกาแฟอาราบิก้า isolate RZ 007 จังหวัดเชียงใหม่ จำแนกชนิดเป็น *Rhizoctonia solani* ซึ่งมีนิวเคลียสหลายนิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (multinucleate) (ตารางที่ 2 และ 3)

สำหรับ *Rhizoctonia* isolate ที่ RZ 003, RZ 004, RZ 005 และ RZ 006 ซึ่งแยกได้จากกาแฟพันธุ์อาราบิก้า จังหวัดเชียงใหม่ จำแนกชนิดเป็น *Ceratobasidium noxium* ซึ่งมีจำนวนนิวเคลียส 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (binucleate) (ตารางที่ 2 และ 3)

นอกจากนั้นยังพบเชื้อรา *Rhizoctonia* isolate RZ 014 และ RZ 001 ที่แยกได้จากสละ และขมิ้น มีลักษณะนิวเคลียสเป็น binucleate และจำแนกได้เป็น *Rhizoctonia* sp. 1 และ *Rhizoctonia* sp. 2 (ตารางที่ 2 และ 3)

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizoctonia*

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizoctonia* ทั้ง 4 ชนิด ที่แยกได้จากพืช 8 ชนิดมีรายละเอียดดังนี้

***Rhizoctonia solani* Khün**

จากการศึกษาพบเชื้อรา *R. solani* บนกาแฟพันธุ์อาราบิก้า และพันธุ์โรบัสต้า สละ ทุเรียน ลำไย ข้าว ฝ้าย และกวางตุ้ง ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ (ตารางที่ 2 และ3)

สายพันธุ์: RZ 007, RZ 008, RZ 009, RZ 010, RZ 011, RZ 012, RZ 013 (ภาพที่ 3), RZ 015, RZ 016, RZ 010, RZ 011, RZ 012, RZ 013, RZ 015, RZ 016, RZ 017, RZ 018, RZ 019, RZ 020, RZ 021, RZ 022, RZ 023, RZ 024, RZ 025, RZ 026, RZ 027, RZ 028, RZ 029, RZ 030, RZ 031, RZ 032, RZ 033, RZ 034, RZ 035, RZ 036, RZ 037, RZ 038, RZ 039

ลักษณะของ+ราบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการ โคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลแก่ เชื้อราที่อายุ 2 วัน เริ่มสร้างเม็ด sclerotium โดยในระยะนี้จะสังเกตเห็นว่าเส้นใยเจริญแบนราบไปกับผิวอาหารเป็นส่วนใหญ่ สีของเส้นใยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในที่สุด เม็ด sclerotium นอกจากมีรูปร่างทรงกลมแล้ว บนผิวของเม็ด sclerotium จะพบว่ามีรูและมีหยดน้ำเกาะอยู่ทั่วไป การกระจายของเม็ด sclerotium บนอาหารกระจายทั่วทั้งผิวอาหารแต่จะเกิดหนาแน่นบริเวณขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนใหญ่ (ตารางที่ 3)

เส้นใยของเชื้อราในระยะแรกใส ไม่มีสี ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ความกว้างของเส้นใยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 5.0-11.5 ไมครอน ภายในเส้นใยมีผนังกั้นเซลล์เป็นระยะ ๆ และมีจำนวนหลายนิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (multinucleate) เส้นใยมีลักษณะฟูและหยาบส่วนใหญ่เจริญเหนือวุ้นอาหาร และมีการเจริญเติบโตเร็วมาก เส้นใยหลักแตกแขนงเป็นมุมฉากและเป็นมุมแหลม ตำแหน่งที่แตกแขนงมักอยู่ใกล้ผนังกั้นเซลล์ด้านปลายเส้นใย เส้นใยที่แตกแขนงจากเส้นใยหลักนั้นพบว่าคอดเล็กน้อยตรงบริเวณโคนที่ติดกับเส้นใยหลักและยังพบว่ามีผนังกั้นเซลล์เกิดขึ้นในเส้นใยที่แตกใหม่บริเวณใกล้กับรอยคอดนั้น เมื่อเส้นใยแก่ผนังเส้นใยจะหนาขึ้น และสีของเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง และสีน้ำตาลในที่สุด เส้นใยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะเป็นเซลล์สั้น ๆ ผนังหนา ขนาดใหญ่เรียกว่า monilioid cell ซึ่งมีรูปร่าง doliform cell และ irregular มีการแตกแขนงสร้าง monilioid cell มากขึ้นและพันกันเป็นกลุ่มใหญ่เกิดเป็น sclerotium เรียกว่า microsclerotium คือลักษณะที่กลุ่มของ monilioid cell รวมตัวกันอย่างหลวม ๆ และไม่มีการแบ่งชั้นของเนื้อเยื่อภายในเม็ด sclerotium ทั้งหมด (ตารางที่ 3)

Ceratobasidium noxium (Donk) P. Robert comb. Nov.

Syn. *Koleroga noxia* Donk

Corticium koleroga (Cooke) von Hoehnel

Pellicularia koleroga Cooke

จากการศึกษาพบรา *Ceratobasidium noxium* บนกาแฟอาราบิก้าในจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้

สายพันธุ์: RZ 003, RZ 004, RZ 005, RZ 006

ลักษณะของโคโลนีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร บนอาหาร PDAอายุ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ระยะแรกโคโลนีมีสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนถึงน้ำตาลอ่อน มีลักษณะเป็น zonation ราสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำตาลอ่อน ใต้วุ้นอาหาร (ตารางที่ 3)

เส้นใยของราเริ่มแรกใส ไม่มีสี ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนถึงน้ำตาลอ่อน ความกว้างของเส้นใยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 3.0-7.5 ไมครอน ภายในมีผนังกั้นเซลล์เป็นระยะ ๆ และมีจำนวน 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (binucleate) เส้นใหญ่หลักแตกแขนงเป็นมุมฉากและเป็นมุมแหลม ตำแหน่งที่แตกแขนงมักอยู่ใกล้หนังกั้นเซลล์ด้านปลายเส้นใย สร้าง monilioid cell รูปร่าง barell-shape และพบว่า monilioid cell รวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เป็นกลุ่มใต้วุ้นอาหาร เรียกว่า microsclerotium

ราเข้าทำลายยอดอ่อน ใบ กิ่งและผลที่กำลังเจริญเติบโต เส้นใยเจริญเติบโตอยู่ระหว่างเซลล์ของใบ สามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อของใบ ทำให้ใบเน่า ใบเปลี่ยนเป็นสีดำและลุกลามไปยังส่วนอื่น ๆ เส้นใยเจริญด้านใต้ใบคล้ายใยของแมงมุม ต่อมาเส้นใยเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาล ลักษณะหยาบ คล้ายเส้นด้าย เจริญอย่างรวดเร็วทำให้ใบเน่าดำ และใบแห้งจะหลุดออกจากขั้ว ใบร่วงจากกิ่งแต่มีเส้นใยพันกันอยู่ทำให้ใบติดกันและไม่ร่วงลงดิน

การระบาดของโรคมักเกิดในฤดูฝน ช่วงที่มีฝนตกติดต่อกันหลายวัน โดยที่ต้นกาแฟไม่ได้รับแสงแดด และถ้าแปลงกาแฟมีสภาพค่อนข้างทึบ ก็จะทำให้เกิดการระบาดของโรคเน่าดำได้ง่าย ดังนั้นการระบาดของโรคขึ้นกับความชื้น

***Rhizoctonia* sp.1**

จากการศึกษาพบรา *Rhizoctonia* sp. 1 บนขมิ้นในจังหวัดจันทบุรีซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้

สายพันธุ์: RZ 001, RZ 002

โคโลนีบนอาหาร PDAอายุ 6 วัน เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ระยะแรกโคโลนีมีสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีลักษณะเป็น zonation (ตารางที่ 3)

เส้นใยของราเริ่มแรกใส ไม่มีสี ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ความกว้างของเส้นใยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 6.0-8.0 ไมครอน ภายในมีผนังกั้นเซลล์เป็นระยะ ๆ และมีจำนวน 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (binucleate) เส้น

ใหญ่หลักแตกแขนงเป็นมุมฉากและเป็นมุมแหลม ตำแหน่งที่แตกแขนงมักอยู่ใกล้หนังกั้นเซลล์ด้านปลายเส้น สร้าง monilioid cell รูปร่าง clavate และ obpyriform สร้าง sclerotium สีน้ำตาลบนอาหาร (ตารางที่ 3)

***Rhizoctonia* sp.2**

จากการศึกษาพบรา *Rhizoctonia* sp. 2 บนสละในจังหวัดจันทบุรีซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยา ดังนี้

สายพันธุ์: RZ 014

โคโลนีบนอาหาร PDAอายุ 5 วัน เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการ ระยะแรกโคโลนีมีสีขาวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีลักษณะเป็น zonation (ตารางที่ 3)

เส้นใยของราเริ่มแรกใส ไม่มีสี ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงน้ำตาลแก่ เส้นใยฟู ขนาดเส้นใยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 5.5-11.5 ไมครอน ภายในมีผนังกั้นเซลล์เป็นระยะ ๆ และมีจำนวน 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (binucleate) เส้นใหญ่หลักแตกแขนงเป็นมุมฉากและเป็นมุมแหลม ตำแหน่งที่แตกแขนงมักอยู่ใกล้หนังกั้นเซลล์ด้านปลายเส้น สร้าง monilioid cell รูปร่าง globose –sub globose สร้าง sclerotium สีน้ำตาลบนอาหาร (ตารางที่ 3)

3. ผลการศึกษาสรีรวิทยาของรา

3.1 ผลการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบติดทุเรียน บนอาหาร 8 ชนิด

เส้นใยรา *Rhizoctonia solani* เจริญได้ดีบนอาหาร OMA, V-8, PYDA และ PDA หลังจากราเจริญบนอาหาร 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 8.45, 8.44, 8.25 และ 8.09 เซนติเมตร ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว (ตารางที่ 4)

เส้นใยรา *Rhizoctonia solani* เจริญได้ดีรองลงมาบนอาหาร CZA และ CMA หลังจากราเจริญบนอาหาร 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 7.53 และ 6.35 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

เส้นใยของรา *Rhizoctonia solani* เจริญได้ช้าบนอาหาร WA และ MEA หลังจากราเจริญบนอาหาร 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 4.76 และ 3.39 เซนติเมตร (ตารางที 4)

3.2 ผลการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรา *Ceratobasidium noxium* สาเหตุโรคเน่าดำของกาแฟบนอาหาร 8 ชนิด

เส้นใยรา *Ceratobasidium noxium* เจริญได้ดีบนอาหาร OMA, V-8, PDA และ PYDA หลังจากราเจริญบนอาหาร 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 8.72, 8.64, 8.38 และ 7.99 เซนติเมตร ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว (ตารางที่ 5)

เส้นใยรา *Ceratobasidium noxium* เจริญได้ดีรองลงมาบนอาหาร CZA และ CMA หลังจากราเจริญบนอาหาร 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 7.37 และ 6.47 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

เส้นใยของรา *Ceratobasidium noxium* เจริญช้าบนอาหาร WA และ MEA หลังจากราเจริญบนอาหาร 7 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีได้ 4.20 และ 3.44 เซนติเมตร (ตารางที่ 5)

4. การชักนำให้ราสร้างระยะ teleomorphic state

จากการศึกษาการชักนำราให้สร้างระยะ teleomorphic state ในห้องปฏิบัติการ โดยย้ายราจากอาหารที่ธาตุอาหารสมบูรณ์ไปยังอาหารที่ไม่มีธาตุอาหาร และ การเลี้ยงเชื้อราบนอาหารผสม marmite จากการทดลองครั้งนี้พบว่าราไม่สร้างระยะ teleomorph state ทั้งสองวิธี แต่ราสร้างเส้นใยฟูเหนืออาหารเป็นจำนวนมากในอาหารที่มีส่วนผสมของ marmite

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจาก *Rhizoctonia* ของพืช 8 ชนิดได้แก่ กาแฟ ข้าว ขมิ้น ลำไย ทุเรียน ฝ้าย สละ และกวางตุ้ง จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย จำแนกชนิดเชื้อราได้ 2 สกุล 4 ชนิด รวม 39 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rhizoctonia solani, Ceratobasidium noxium, Rhizoctonia* sp. 1 และ *Rhizoctonia* sp. 2 รา *R. solani* มีจำนวนนิวเคลียสหลายนิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (multinucleate) รา *C. noxium, Rhizoctonia* sp. 1 และ *Rhizoctonia* sp. 2 มีจำนวนนิวเคลียส 2 นิวเคลียสต่อ 1 เซลล์ (bitinucleate) ลำดับ เส้นใยรา *R. solani* และ *C. noxium* เจริญได้ดีบนอาหาร OMA, V-8, PYDA และ PDA และพบว่า ราทั้ง 2 ไม่สร้างระยะ teleomorphic state บนอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Bandoni, R.J. 1979. Safranin as a rapid nuclear strain for fungi. Mycologia 71: 873-847.

Bernard, N. 1909. L'evolution dans la symbiose des orchide'es et leur champignons

commensaux. Ann. Sci. Nat. Paris 9. Se'r. 9 : 1-196.

Butler, E.E. 1980. A method for long-time culture storage of *Rhizoctonia solani*. Phytophathology 70: 820-821.

Donk, M.A. 1974. Check list of European Hymenomycetous Heterobisidiae. Supplement and correction. Persoonia 8: 33.

Ito, K., S. Kontani, and H. Kondo. 1955. Web-blight fungus of Japanese larch seedlings. Bull. Gov. Forest Exp. Sta. 79: 43-63.

Matsumoto, T., W. Yamamoto, and S. Hirane.1932. Physiology and parasitology of the fungi generally referred to as *Hypochnus* Sasakii Shirai. I. Differentiation of the strains by means of hyphal fusion and culture in differential media. L. Soc. Trop. Agric. 4: 370-388.

Moore, R.T. 1985. The challenge of the dolipore/ parenthesome septum. P. 175-212. *In* Developmental Biology of Higher Fungi. Cambridge Universi Press, Cambridge.

Moore, R. T. 1987. The genera of *Rhizoctonia* – like fungi : *Ascorhizoctonia*, C*eratorhiza* gen. Nov., *Epulorhiza* gen. Nov., *Moniliopsis* and *Rhizoctonia*. Mycotaxon 29 : 91-99.

Moore, R. T. 1996. The dolipore/parenthesome septum modern taxonomy. P. 13-35. *In* *Rhizoctonia* Speciec ; Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control by Sneh, B, Suha Jabji-Hare, Stephen Neate and Gerda Dijst. 1996. Kluwer Academic Publishers. 578 pp.

Murray, D.I.L. 1982. A modified procedure for fruiting *Rhizoctonia solani* on agar. Trans. Br. Mycol. Soc. 79: 129-135.

Murray, D.I.L. 1985. Cultural conditions influencing basidium formation in the Ceratobasidiaceae. Aus. J. Bot. 32: 101-108.

Ogoshi, A. 1975. Grouping of *Rhizoctonia solani* Kuehn with hyphal anastomosis. Ann. Ogoshi, A. 1996. Phytopath. Soc. Japan 38: 117-122.

Ogoshi, A. 1996. Introduction – the genus *Rhizoctonia*. P. 1-9. *In Rhizoctonia* Speciec ; Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control by Sneh, B, Suha Jabji-Hare, Stephen Neate and Gerda Dijst. 1996. Kluwer Academic Publishers. 578 pp.

Papavizas, G.C. 1965. Comparative studies on single basidiospore isolates of *Rhizoctonia*. Sci. Agr. 12: 178-182.

Parmeter, J. R. and H. S. Whitney. 1970 Taxonomy and Nomenclature of the Imperfect state. P. 7-19. *In* Rhizoctonia Solani, Biology and Pathology by Parmeter, J.R. 1970. University of California Press. 255 pp.

Parmeter, J. R. R.T. Sherwood, and W.D. Platt. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytophthology 59: 1270-1278.

Richter, H. and Schneider, R. 1953. Untersuchungen zur morphologischen und biologischen differencierung vor *Rhizoctonia solani* K. Phytopath. Z. 20: 167-226.

Roberts, P. 1999. Rhizoctonia – forming fungi : A tanonomic guide. Whistable Litho Printers Ltd., Whistable, Kent. 239 pp.

Sneh, B., L. Burpee and A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. APS Press. 133 pp.

Smith, D., and , A.H.S. Onions. 1994. The perservation and maintenance of living fungi, 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, U.K. 122p.

Walker, W.F and W.F Doolittle. 1983. 5S rRNA sequences from eight basidiomycetes and fungi imperfecti. Nucleic Acids Res. 11: 7625-7630.

ตารางที่ 1 ชนิดและส่วนของพืชที่เป็นโรคจากรา *Rhizoctonia* จากจังหวัดต่าง ๆ และจำนวนสายพันธุ์รา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากพืช 8 ชนิด

พืชอาศัย	ส่วนของพืชที่เก็บ	สถานที่เก็บ (จังหวัด)	สายพันธุ์ (Isolates)
ขมิ้น	ลำต้น	จันทบุรี	RZ 001, RZ 002
กาแฟ พันธุ์อาราบิก้า	ใบ	เชียงใหม่	RZ 003, RZ 004, RZ 005, RZ 006
กาแฟ พันธุ์อาราบิก้า	ใบ	เชียงใหม่	RZ 007
กาแฟ พันธุ์โรบัสต้า	ใบ	สุราษฎร์ธานี	RZ 008
สละ	ผล	จันทบุรี	RZ 009, RZ 010
สละ	ผล	ตราด	RZ 011, RZ 012, RZ 013
สละ	ผล	ตราด	RZ 014
สละ	ลำต้น	ปทุมธานี	RZ 015, RZ 016
ทุเรียน	ใบ	จันทบุรี	RZ 017, RZ 018, RZ 019, RZ 020, RZ 021, RZ 022
ทุเรียน	ใบ	ชุมพร	RZ 023, RZ 024,RZ 025
ทุเรียน	ใบ	ระยอง	RZ 026, RZ 027,RZ 028
ทุเรียน	ใบ	ตราด	RZ 029, RZ 030
ข้าว	กาบใบ ลำต้น	สุพรรณบุรี	RZ 031, RZ 032, RZ 033
ฝ้าย	ต้นกล้า	นครราชสีมา	RZ 034
ลำไย	ใบ	อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่	RZ 035
ลำไย	ใบ	อ.พร้าว จ.เชียงใหม่	RZ 036
กวางตุ้ง	โคนต้น	นราธิวาส	RZ 037, RZ 038, RZ 039

ตารางที่ 2 วิธีการแยก เชื้อสาเหตุ และชนิดของรา *Rhizoctonia* จากพืช 8 ชนิด จากแหล่งต่าง ๆ

พืชอาศัย	สถานที่เก็บ (จังหวัด)	วิธีการแยกรา	ชนิดของรา
ขมิ้น	จันทบุรี	Tissue transplanting	*Rhizoctonia* sp.
กาแฟ พันธุ์อาราบิก้า	เชียงใหม่	Tissue transplanting	*Ceratobasidium noxium*
กาแฟ พันธุ์อาราบิก้า	เชียงใหม่	Tissue transplanting	*Rhizoctonia sp.* 1
กาแฟ พันธุ์โรบัสต้า	สุราษฎร์ธานี	Tissue transplanting	*Rhizoctonia* sp. 1
สละ	จันทบุรี	Direct isolation	*Rhizoctonia solani*
สละ	ตราด	Direct isolation	*Rhizoctonia solani*
สละ	ตราด	Tissue transplanting	*Rhizoctonia* sp. 2
สละ	ปทุมธานี	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
ทุเรียน	จันทบุรี	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
ทุเรียน	ชุมพร	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
ทุเรียน	ระยอง	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
ทุเรียน	ตราด	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
ข้าว	สุพรรณบุรี	Baiting technique	*Rhizoctonia solani*
ฝ้าย	นครราชสีมา	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
ลำไย	เชียงใหม่	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*
กวางตุ้ง	นราธิวาส	Tissue transplanting	*Rhizoctonia solani*

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะต่าง ๆ ของรา *Rhizoctonia* บนพืช 8 ชนิด

Fungi	Diameter of runner hyphae (μm)	Mecelial color	nucleus	Scerotial color	Monilioid cell size (cm)	Host
Rhizoctonia sp1.	6.0-8.0	white to light brown	binucleate	brown	Clavate, obpyriform	ขมิ้น
Ceratobasidium noxium	3-7.5	white to buff	binucleate	light brown	Barell-shaped	กาแฟ
Rhizoctonia solani	7.0-11.0	white to brown	multi nucleate	brown	Doliform cell-irregular	กาแฟ
Rhizoctonia solani	6.0-11.0	white to brown	multi nucleate	brown	Doliform cell-irregular	กาแฟ
Rhizoctonia solani	7.0-9.0	white to brown	multi nucleate	Light brown to brown	Doliform cell-irregular	ข้าว
Rhizoctonia solani	5.2-10.0	white to brown	multi nucleate	Brown	Doliform cell-irregular	ฝ้าย
Rhizoctonia sp 2.	5.5-11.5	white to dark brown	binucleate	brown	Globose-sub globose	สละ
Rhizoctonia solani	6.0-9.0	white to dark brown	multi nucleate	dark brown	Doliform cell-irregular	ทุเรียน
Rhizoctonia solani	6.0-8.5	white to brown	multi nucleate	brown	Doliform cell-irregular	ลำไย
Rhizoctonia solani	5.5-8.5	White to light brown	multi nucleate	brown	Doliform cell-irregular	กวางตุ้ง

ตารางที่ 4 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของรา *Rhizoctonia solani* สาเหตุโรคใบติดทุเรียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด

อาหาร	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
1. Potato dextrose agar (PDA)	8.09[ab]
2. Potato dextrose yeast agar (PDYA)	8.25[ab]
3. V8 juice agar (V-8)	8.44[a]
4. Oat meal agar (OMA)	8.54[a]
5. Corn meal agar (CMA)	6.35[c]
6. Czapek's agar (CZA)	7.53[b]
7. Malt extract agar (MEA)	3.39[e]
8. Water agar (WA)	4.76[d]

ตารางที่ 5 เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของรา *Ceratobasidium noxium* สาเหตุโรคเน่าดำของกาแฟบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด

อาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)
1. Potato dextrose agar (PDA)	8.38[ab]
2. Potato dextrose yeast agar (PDYA)	7.99[ab]
3. V8 juice agar (V-8)	8.64[a]
4. Oat meal agar (OMA)	8.72[a]
5. Corn meal agar (CMA)	6.47[c]
6. Czapek's agar (CZA)	7.37[b]
7. Malt extract agar (MEA)	3.44[e]
8. Water agar (WA)	4.20[d]

Key to *Rhizoctonia* species

1. The cellular nuclear number (CNN) close to the tips of young hyphae is usually 2 (less frequently 1-3), ความกว้างของเส้นใยหลักน้อยกว่า 7 ไมครอน.....Binucleate Rhizoctonia spp. (2)
   The CNN close to the tips in young hyphae is greater than 2. ความกว้างของเส้นใยหลักน้อยกว่า 7 ไมครอน.....Multinucleate Rhizoctonia spp. (5)
2. โคโลนีสีขาวถึงน้ำตาล..... (3)
   โคโลนีสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน..... (4)
3. สร้าง sclerotium สีน้ำตาล และ monilioid รูปร่าง คล้ายกระบอง ……....*Rhizoctonia* sp. 1
   สร้าง sclerotium สีน้ำตาล และ monilioid รูปร่างกลม ……*Rhizoctonia* sp. 2
4. สร้าง microsclerotium สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างคล้ายถังเบียร์
   Colony มี zonation.....*Ceratobasidium noxium*
   สร้าง microsclerotium สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างคล้ายถังเบียร์
   Colony ไม่เกิด zonation……... *Ceratobasidium cerealis*
5. เส้นใยสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม ถ้าสร้าง sclerotium จะมีรูปร่างไม่แน่นอน มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม สร้าง monilioid รูปร่างต่าง ๆ .....*Rhizoctonia solani*

Key to *Rhizoctonia solani* บนพืชอาศัยต่าง ๆ

6. monilioid รูปร่าง doliform cell-irregular shape…….....(7)
   monilioid รูปร่าง globose –subglobose…….(8)
7. ความกว้างของเส้นใย 8-11 ไมครอน.....กาแฟ
   ความกว้างของเส้นใย 7.5-9 ไมครอน สร้าง sclerotium สีน้ำตาลอ่อน ถึงสีน้ำตาลเข้ม.....ข้าว
   ความกว้างของเส้นใย 9-10 ไมครอน สร้าง sclerotium สีน้ำตาล.....ฝ้าย
   ความกว้างของเส้นใย 9-12 ไมครอน สร้าง sclerotium สีน้ำตาล.....ลำไย
   ความกว้างของเส้นใย 9-11 ไมครอน สร้าง sclerotium สีน้ำตาลเข้ม.....ทุเรียน
   ความกว้างของเส้นใย 7.5-8.5 ไมครอน สร้าง sclerotium สีน้ำตาล.....กวางตุ้ง

รวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจ

Collection and Identification of *Colletotrichum* spp.Causing Anthracnose of Fruit and Economic Crop

ธารทิพย ภาสบุตร **กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์**

ธนิตย์ ปล่องบรรจง

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่เป็นโรค แอนแทรกโนส (anthracnose) ในพื้นที่จังหวัดกรุงเทพฯ กาญจนบุรี ขอนแก่น จันทบุรี ฉะเชิงเทรา เชียงราย เชียงใหม่ ชุมพร ตรัง ตราด ตาก นครนายก นครปฐม นครพนม นครราชสีมา นนทบุรี บุรีรัมย์ ปทุมธานี ปราจีนบุรี พังงา พิจิตร เพชรบุรี ระยอง ราชบุรี ลพบุรี ลำพูน ศรีสะเกษ สกลนคร สระแก้ว สุพรรณบุรี สุราษฎร์ธานี สมุทรสาคร สุโขทัย หนองคาย และอุบลราชธานี แล้วนำมาแยกรา *Colletotrichum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรค โดยใช้วิธี Tissue Transplant Technique แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ภายใต้แสง NUV 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และลักษณะของแอพเพรสซอเรีย (appressoria) จากการเลี้ยงแบบ slide culture บนอาหาร PCA ที่บ่มไว้ในสภาพเดียวกัน เพื่อการจำแนกชนิด ผลการศึกษารา *Colletotrichum* ที่แยกได้ 110 ไอโซเลท สามารถจำแนกชนิด (species) ได้ 5 ชนิด คือ 1.*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ ฝรั่ง มะละกอ ชมพู่ มะม่วง สตรอเบอร์รี่ อโวกาโด องุ่น มะขามเทศ กาแฟ ยางพารา หอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ กุยช่าย พริกไทย หน่อไม้ฝรั่ง พริก หน้าวัว ดาหลา และกุหลาบ 2.*Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. & Bisby เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ พริก และมะละกอ 3.*Colletotrichum circinans* (Berk.) Vogl.เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของหอมแบ่ง 4.*Colletotrichum acutatum* Simmonds เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ พริก และ สตรอเบอร์รี่ 5.*Colletotrichum truncatum* (Schr.) Andrus & Moore เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ ถั่วเหลืองและถั่วแดงหลวง

คำนำ

Colletotrichum spp. เป็นราจัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina form-class Coelomycetes form-order Melanconiales form-family Melanconiaceae (Ainswort,1973) ลักษณะทั่วไปของราคือ สร้างเส้นใยฝังอยู่ในผิวพืช เส้นใยไม่มีสี หรือสีน้ำตาลอ่อน จนถึงน้ำตาลแก่ แตกกิ่งก้าน มีผนังกั้น โคนิเดีย (conidia) เกิดบนก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) ซึ่งมีกำเนิดจาก stromatic cell ของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่เรียกว่า อเซอวูลัส (acervulus) ใต้ชั้น epidermis ของพืช เมื่อแก่จะดันผิวพืชให้แตกออก โคนิเดียจะถูกปล่อยออกมาเป็นกลุ่มในลักษณะแห้ง หรือของเหลวข้น สีเหลืองอ่อนหรือสีส้มอมชมพู เมื่อนำรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ราจะสร้างโคนิเดียเป็นกลุ่มบน stromatic cell คล้าย sporodochium การสังเกตลักษณะของอเซอวูลัสจึงต้องดูจากสภาพธรรมชาติ หรือบนพืชอาศัย บางครั้งพบการสร้าง sclerotia บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคนิเดียเดี่ยวๆไม่มีสี เซลล์เดียว ผนังบาง เรียบ ลักษณะรูปร่างรูปไข่ หรือ ยาวรี ตรงหรือโค้ง อาจมี guttule อยู่ภายใน มีการสร้าง sterile hypha สีน้ำตาล ผนังหนาเรียบ ปลายแหลมคล้ายหนามเรียกว่า setae เกิดบริเวณขอบของอเซอวูลัส หรือปะปนอยู่กับก้านชูโคนิเดีย ลักษณะการสร้าง setae ของรานี้เป็นลักษณะที่ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ แอพเพรสซอเรีย (appressoria) สีน้ำตาล ผนังสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม กลมรี คล้ายกระบอง หรือรูปร่างไม่แน่นอน บางครั้งผนังมีรอยหยัก (lobe) สร้างเดี่ยวๆ หรือเกิดติดกันเป็นกลุ่ม teleomorph state ของรา *Colletotrichum* จัดอยู่ในสกุล *Glomerella* (Sutton,1980 ; วิจัย,2546)

ความสำคัญทางด้านโรคพืช *Colletotrichum* spp. เป็นราที่มีความสำคัญมากสกุลหนึ่ง เป็นสาเหตุโรคพืชที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า โรคแอนแทรกโนส (anthracnose) เข้าทำลายได้เกือบทุกส่วนของพืชตั้งแต่ต้นกล้า ใบ ก้านใบ ลำต้น ดอก และผล มีพืชอาศัยมากถึง 470 สกุล (Sutton, 1980) เช่น โรคแอนแทรกโนสในระยะกล้าของฝ้าย โรคแอนแทรกโนสบนใบและผลของอโวกาโดและมะม่วง (Holliday,1980; Waller,1992) ในประเทศไทยพบเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพืชที่สำคัญหลายชนิด มีรายงานการศึกษาอนุกรมวิธานรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของพืชต่างๆ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า *C. higginsianum C. truncatum C. capsici C. fulcatum* และ *C. sublineolu*m ทำให้เกิดโรคกับผักกวางตุ้ง ถั่วเขียวเมล็ดดำ มะเขือเทศ อ้อย ข้าวฟ่าง ตามลำดับ และ *C. gloeosporioides* ทำให้เกิดโรคกับ พริกไทย ถั่วเหลือง กุยช่าย หน่อไม้ฝรั่ง มะม่วงหิมพานต์ และส้มโอ (วิรัช, 2528)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พืชอาศัย เขตการแพร่กระจายของรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย ซึ่งข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญสำหรับงานด้านอารักขาพืช และเป็นประโยชน์สำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) รวมทั้งได้สายพันธุ์ราโรคพืชไว้ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืชเพื่อการอนุรักษ์ไว้ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆต่อไป

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคแอนแทรกโนส จากแหล่งปลูกพืชต่างๆในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ WA (Water Agar) PDA (Potato Dextrose Agar) PCA (Potato Carrot Agar)
3. กล้อง Stereomicroscope กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง กล้องถ่ายภาพและอุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

<u>วิธีการ</u>

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

   รวบรวมตัวอย่างพืชที่เป็นโรคแอนแทรกโนสจากแหล่งปลูกพืชต่างๆของประเทศ บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก บันทึกลักษณะอาการ ถ่ายภาพอาการของโรค

2. การแยกเชื้อ *Colletotrichum* จากพืชที่เป็นโรค

moist chamber method นำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรควางบนกระดาษกรองในจานเลี้ยงเชื้อ เพิ่มความชื้นโดยใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูด้วยกล้อง stereomicroscope

tissue transplanting method ตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติให้มีขนาดประมาณ 3x3 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วย chlorox ความเข้มข้น 10 % นาน 3-4 นาที ย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อนาน 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญออกมาทำการแยกเชื้อลงบนอาหารบนอาหารที่เหมาะสม

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

   3.1 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการทำสปอร์เดี่ยว (single spore technique)

   เขี่ยกลุ่มโคนิเดียลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำโคนิเดียแขวนลอยให้มีปริมาณ 10 โคนิเดีย ต่อ 1 loop ภายใต้เลนส์ objective กำลังขยาย 40 X จากนั้นใช้loop ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในโคนิเดียแขวนลอยที่ทำไว้ แล้วนำมา streak ลงบนผิวหน้าอาหาร WA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ตักโคนิเดียที่งอกแล้วย้ายไปเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม

   3.2 การจำแนกชนิด

   ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและจำแนกชนิด (species) ตามวิธีการของ Sutton (1980) ตามขั้นตอนดังนี้

   3.2.1 ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีของรา *Colletotrichum* บริสุทธิ์ ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อและไว้ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอด NUV (near ultra – violet) 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนี และศึกษารูปร่างรวมทั้งวัดขนาดของ โคนิเดีย

3.2.2 ศึกษาลักษณะของแอพเพรสซอเรียโดยการเลี้ยงราแบบ slide culture บนอาหาร PCA ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ประมาณ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่างด้วยหลอด NUV (near ultra – violet) 12 ชั่วโมง สลับกับความมืด 12 ชั่วโมง ศึกษารูปร่างและวัดขนาดแอพเพรสซอเรีย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างไม้ผล และพืชเศรษฐกิจที่เป็นโรคแอนแทรกโนสที่เกิดจากรา *Colletotrichum* spp. ในท้องที่จังหวัดและภาคต่างๆของประเทศรวม 120 ตัวอย่าง แยกรา *Colletotrichum* spp. จากส่วนของพืชที่เป็นโรคโดยวิธี moist chamber และ tissue transplanting ได้ทั้งหมด 110 ไอโซเลท

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะของแอพเพรสซอเรีย เพื่อจำแนกชนิดตามวิธีการและระบบของ Sutton (1980) สามารถจำแนกรา *Colletotrichum* spp. ได้ 5 ชนิด

***Colletotrichum acutatum* Simmonds**

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เส้นใยเจริญหนาแน่น เมื่อยังอ่อนเส้นใยมีสีขาวต่อมาจะค่อยๆเปลี่ยน เป็นสีเทาอมชมพู ด้านตรงข้ามโคโลนีสีส้มอมชมพู ไม่สร้าง sclerotia และ setae โคนิเดียมีลักษณะเป็นรูปกระสวย เซลล์เดียว ไม่มีสี ขนาดที่วัดได้ประมาณ 10.36-18.13 x 2.59-5.18 ไมครอน หลังจากเลี้ยงแบบ slide culture โดยใช้อาหาร PCA ประมาณ 3-5 วัน ราจะสร้างแอพเพรสซอเรียสีน้ำตาลอ่อน ผนังหนา สีน้ำตาลเข้ม รูปร่างคล้ายกระบอง มีทั้งผนังเรียบและเกิดรอยหยัก (lobe) ขนาดที่วัดได้ประมาณ 2.59-9.07x 4.92-20.72 ไมครอน

พืชอาศัย สตรอเบอร์รี่ (Strawberry; *Fragaria chiloensis* Duchesne)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose), กอเน่า (crown rot)

ลักษณะอาการ เริ่มจากแผลขนาดเล็กรูปรี บนสายไหล (stolon) ขอบแผลสีม่วงแดง ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน แล้วขยายยาวไปตามสายไหล ต่อมาแผลจะเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลเข้ม ขอบสีเหลืองอมชมพูซีด แผลจะแห้งทำให้เกิดรอยคอดของไหลบริเวณแผล เมื่อสภาพอากาศเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ สตรอเบอร์รี่จะแสดงอาการใบเฉาและเหี่ยวอย่างรวดเร็ว เนื้อเยื่อส่วนกอด้านในมีลักษณะเน่าแห้ง สีน้ำตาลแดง

ผล แผลรูปวงรี สีน้ำตาลเข้ม เนื้อเยื่อบุ๋มลึกลงไปในผิวผล ขอบแผลไม่เด่นชัด เมื่อความชื้นสูง เห็นกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีส้มเกิดขึ้นบริเวณแผล

แหล่งที่พบ อ.แม่ริม อ.สะเมิง อ.ฝาง อ.ขุนวาง และ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

มีรายงานว่า *C. acutatum* เป็นราที่มีความสำคัญก่อให้เกิดความเสียหายมากกับสตรอเบอร์รี่ที่ปลูกในประเทศยุโรปและเป็นราสาเหตุโรคที่มีเขตแพร่กระจายทั่วโลก (Denoyes and Baudry, 1995) มีการ *จำแนกชนิด* ของรา *Colletotrichum ที่แยก (*isolate) *จากสตรอเบอร์รี่ที่เป็นโรค พบว่าสามารถจำแนกได้ 3 ชนิดคือ C. acutatum*, *C. gloeosporioides* และ *C. fragariae (* Maas, 1984)

พืชอาศัย พริกขี้หนู พันธุ์จินดา (Bird Chili; *Capsicum frutescens*)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose) , กุ้งแห้ง

ลักษณะอาการ พบบนผลพริกที่เริ่มสุก โดยเกิดจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก จุดแผลบุ๋มลึกลงเล็กน้อย ต่อมาจะขยายใหญ่เป็นแผลรูปวงรี ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลไม่ชัดเจน มีตุ่มแข็งเล็กๆสีดำเรียงซ้อนกันเป็นรูปวงรีหลายชั้นที่บริเวณแผล ถ้าความชื้นสูงจะเห็นกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีส้มและมีเส้นสีดำ (setae) ปะปนอยู่

แหล่งที่พบ อ.สวรรคโลก จ.สุโขทัย

***Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby**

<u>ชื่อพ้อง</u> *Colletotrichum boerhavi*ae Pavgi & U.P.Singh

*Colletotrichum bryonia*e (Ferr.) Maire

*Colletotrichum oligoch*aetum Cav. Var.*bryoniae* Ferr.

*Colletotrichum corylif*oliae Pavgi & U.P.Singh

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร PDA เส้นใยเหนืออาหารเจริญฟูหนาแน่น เมื่อเชื้อยังอ่อนอยู่เส้นใยสีขาวเทา ต่อมาจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาและเป็นเทาแกมดำ ด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทาแก่ถึงดำ เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ประมาณ 1สัปดาห์ จะเห็นโคนิเดียรวมกลุ่มเป็นหยดน้ำข้นๆ สีเหลืองอ่อน หรือสีชมพูอมส้ม เจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ มี setae ลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ปลายเรียวแหลมเกิดปะปน ไม่พบการสร้าง sclerotia โคนิเดียเดี่ยวๆมีลักษณะโค้ง คล้ายเคียว ปลายด้านหนึ่งแหลม ส่วนอีกด้านหนึ่งค่อนข้างมน ขนาดที่วัดได้ 2.59-3.9 x 18.13-31.08 ไมครอน เมื่อเลี้ยงแบบ slide culture บนอาหาร PCA สร้าง แอพเพรสซอเรีย รูปร่างคล้ายกระบอง

จนถึงรูปร่างค่อนข้างกลม สีน้ำตาล ส่วนมากขอบเรียบ บางครั้งพบเกิดต่อกันเป็นลูกโซ่ ขนาดที่วัดได้ 5.18-12.95 x 5.18-25.90 ไมครอน (ภาพที่ 1)

พืชอาศัย มะละกอ (Papaya ; *Carica papaya* L.)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ ก้านใบ เริ่มแรกจะเกิดเป็นจุดช้ำฉ่ำน้ำ ต่อมาจะขยายเป็นแผลลักษณะคล้ายรูปตาสีฟางแห้ง ขอบแผลไม่เด่นชัด มีตุ่มแข็งเล็กๆสีดำและ setae เรียงซ้อนกันเป็นรูปวงรีหลายชั้นที่บริเวณแผล เมื่อความชื้นสูงจะเห็นโคนิเดียรวมกันเป็นหยดของเหลวข้นสีเหลืองอ่อนถึงสีส้มอมชมพู

ผล แผลช้ำฉ่ำน้ำ สีน้ำตาลอ่อน เนื้อเยื่อพืชบริเวณแผลจะยุบต่ำกว่าระดับเดิม ขอบแผลไม่เด่นชัด เมื่อความชื้นสูงจะเห็นโคนิเดียรวมกันเป็นหยดของเหลวข้นสีเหลืองอ่อนถึงสีส้มอมชมพู เกิดอยู่บนตุ่มแข็งเล็กๆสีดำที่เรียงซ้อนกันเป็นวง พบ setae เกิดกระจายปะปนอยู่ในกลุ่มโคนิเดีย

แหล่งที่พบ อ.พลิ้ว และ อ.เมือง จ.จันทบุรี

พืชอาศัย พริกขี้หนู (Bird Chili; *Capsicum frutescens*)

พริกหยวก (Chili, Hot Pepper;*Capsicum annuum* L.)

พริกชี้ฟ้า (Chili Spur Pepper;*Capsicum annuum* L.var. *acuminatum* Fingerh.)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose) , กุ้งแห้ง

ลักษณะอาการ ผลพริกที่เริ่มสุก เกิดจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก แผลบุ๋มลึกลงเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายใหญ่เป็นรูปวงรีหรือวงกลม ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลไม่ชัดเจน มีตุ่มแข็งเล็กๆสีดำเรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้นที่บริเวณแผล ถ้าความชื้นสูงจะเห็นกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีส้ม และมีเส้นสีดำ (setae) ปะปนอยู่

แหล่งที่พบ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

อ.เมือง จ.พิจิตร

อ.เมือง จ.สกลนคร

อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี

C. capsici เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้าง สามารถทำให้พืชแสดงอาการได้หลายอย่างเช่น die-back ,stem break ,anthracnose leaf spot ,seedling blight เป็นต้น พืชอาศัยของรานี้ได้แก่ พริก ฝ้าย มะเขือยาว ปอกระเจา มะเขือเทศและพืชอื่นๆอีกหลายตระกูล (Mordue,1971) ประเทศไทยมีรายงานว่าเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของมะเขือเทศ ในท้องที่ อ .ห้างฉัตร จ.ลำปาง (วิรัช, 2528) เป็นสาเหตุโรค

แอนแทรกโนสของมะละกอ พบอาการที่ผล ก้านและใบ อาการที่ผลและก้านพบได้ทั่วไป ส่วนอาการที่ใบพบที่ หมู่ 4 ต.เสม็ดเหนือ อ.เมือง จ.ฉะเชิงเทรา (กรรณิการ์, 2528)

***Colletotrichum circinans* (Berk.) Voglino**

ชื่อพ้อง *Vermicularia circinans* Berk.

Colletotrichum dematium (Pers. ex Fr.) Grove forma *circinans* (Berk.) Arx

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร PDA โคโลนีสีน้ำตาลเข้ม กลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดน้ำข้นๆ สีน้ำตาลอมเหลือง ถึงน้ำตาลอมส้ม พบ sclerotia และ setae ลักษณะเป็นเส้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ปลายเรียวแหลม เกิดปะปนกันเจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ โคนิเดียเดี่ยวๆมีลักษณะโค้ง ส่วนปลายเรียวแหลม มี guttulate อยู่ภายใน ขนาดโคนิเดียที่วัดได้ 2.59-5.18 x 12.59-23.31 ไมครอน เมื่อเลี้ยงแบบ slide culture บนอาหาร PCA สร้าง แอพเพรสซอเรียรูปร่างคล้ายกระบอง หรือค่อนข้างกลม บางครั้งพบทั้งสองแบบเกิดอยู่รวมกัน ขนาดที่วัดได้ 6-6.5 x 10-13.5 ไมครอน

พืชอาศัย หอมต้นหรือหอมแบ่ง (Shallot; *Allium ascalonicum* L.)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ ใบ เริ่มแรกจะเกิดเป็นจุดช้ำฉ่ำน้ำสีเขียวหม่น ต่อมาจะขยายเป็นแผลใหญ่ค่อนข้างกลมหรือรี เนื้อเยื่อแผลยุบต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย ขอบแผลไม่เด่นชัด มีตุ่มแข็งเล็กๆ สีน้ำตาลดำเรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น พบกลุ่ม โคนิเดีย ลักษณะเป็นหยดของเหลวข้น เกิดขึ้นบนตุ่มแข็ง เมื่อแผลขยายใหญ่หรือมีหลายแผลมาชนกัน ใบจะหักพับแล้วแห้งตายหรือเน่าตายทั้งต้น

แหล่งที่พบ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

รา *C. circinans* ที่แยกได้มีลักษณะคล้ายกับ Sutton (1980) รายงานไว้ แต่มีขนาดโคนิเดียใหญ่กว่าเล็กน้อย Sutton (1980) รายงานว่าพบรา *C. circinans* ขนาดโคนิเดีย 3.5 x 19-21 ไมครอน บนหอมหัวใหญ่ กุยช่าย ประเทศที่พบราชนิดนี้ได้แก่ บรูไน ฮ่องกง ไนจีเรีย เคนยา อินเดีย เนเธอร์แลนด์ และอังกฤษ เป็นต้น

Walker (1921) รายงานว่า *C. circinans* ทำให้ใบหอมเน่าเสียหายในไร่หรือแปลงปลูก หากรานี้เข้าทำลายที่คอหรือส่วนหัวในช่วงใกล้เก็บเกี่ยว จะทำให้ผลผลิตเสียหายในระหว่างเก็บรักษา เรียกโรคนี้ว่า smudge ในประเทศไทยพบโรคใบเน่าแอนแทรกโนสของ หอมหัวใหญ่ หอมแดง หอมแบ่ง และกุยช่าย ที่เกิดจาก *C. circinans* บ้างแต่ไม่รุนแรงเท่าโรคใบเน่าแอนแทรกโนสที่เกิดจาก *C. gloeosporioides (นิตยาและคณะ, 2533)*

***Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore**

ชื่อพ้อง *Vermicularia truncata* Schw.

Colletotrichum dematium (Pers. ex Fr.) Grove forma *truncatum* (Schw.) Arx

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เส้นใยหนาแน่นเหมือนกำมะหยี่ เมื่อเชื้อยังอ่อนอยู่เส้นใยสีขาว ต่อมาจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทาแก่ ด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทาแก่ถึงดำ เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่จะเห็นกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นของเหลวข้นสีครีม สร้างสเคอโรเทีย (sclerotia) บริเวณกลางโคโลนีมาก ไม่มี setae โคนิเดียเดี่ยวๆมีลักษณะโค้ง ส่วนปลายด้านบนแหลม มี guttulate อยู่ภายในขนาดที่วัดได้ 2.59-3.88 x 20.72-31.08 ไมครอน แอพเพรสซอเรียสีน้ำตาล รูปร่างคล้ายกระบอง ผิวเรียบถึงมีรอยหยักเล็กน้อย ขนาดที่วัดได้ 3.88-6.48 x 7.77-14.24 ไมครอน

พืชอาศัย ถั่วเหลือง (Soybean; *Glycine max* (L.) Merr.)

ถั่วแดงหลวง (Red Kidney Bean; *Phaseolus vulgaris* L.)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ ฝัก เกิดแผลสีน้ำตาล ขอบแผลไม่เด่นชัด พบจุดสีดำเล็กๆ (acervulus) และแท่งสีดำ(setae)เกิดปะปนกระจายอยู่ทั่วไปหรือแสดงลักษณะของวงสีดำซ้อนกันเป็นชั้นๆ เมล็ดภายในฝักจะลีบ

แหล่งที่พบ อ.สวรรคโลก จ.สุโขทัย

อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่

รา *C. truncatum* นอกจากจะเป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของถั่วเหลืองแล้ว วิรัช (2528) รายงานว่าพบรานี้บนถั่วเขียวเมล็ดดำ ที่จังหวัดพิษณุโลกและรานี้สามารถติดมากับเมล็ดได้โดยไม่สามารถเห็นอาการที่ผิดปกติบนเมล็ด

***Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.**

ชื่อพ้อง *Vermicularia gloeosporioides* Penz.

Teleomorph State: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld.& Schrenk

รา *C. gloeosporioides* เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้าง ลักษณะโคโลนีของราที่แยกจากพืชชนิดต่างๆ บางครั้งมีความแตกต่างกัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	บนอาหาร PDA เส้นใยเจริญฟู แต่ไม่หนาแน่น สีขาวเทาถึงสีเทา สีด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทา เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ จะเห็น โคนิเดีย รวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะคล้ายหยดน้ำข้นๆ สีส้มอมชมพู เจริญเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ ไม่พบ setae แต่พบ sclerotia เจริญปะปนอยู่ โคนิเดีย เดี่ยวๆ รูปร่างทรงกระบอก ตรง ปลายมนทั้งสองด้าน เซลล์เดียว ไม่มีสี ขนาดที่วัดได้ประมาณ 2.59-5.18 x 10.36-18.13 ไมครอน แอพเพรสซอเรีย บนอาหาร PCA ที่ได้จากการเลี้ยงแบบ slide culture นาน 3-5 วัน มีสีน้ำตาล ขอบหนาสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ถึงรูปกระบอง หรือรูปร่างไม่แน่นอนมีรอยหยัก (lobe) ขนาดที่วัดได้ประมาณ 2.59-11.66 x 6.48-18.13 ไมครอน
พืชอาศัย	หอมต้นหรือหอมแบ่ง (Shallot; *Allium ascalonicum* L.) หอมหัวใหญ่ (Onion; *Allium cepa* L.) หอมแดงหรือหอมหัว (Multiplier onion; *Allium cepa* var.*aggregatum*) กุยช่าย (Chinese chives; *Allium toberosum*)
ชื่อโรค	แอนแทรกโนส (anthracnose), ใบเน่าแอนแทรกโนส (leaf anthracnose)
ลักษณะอาการ	ใบ ก้านดอก เริ่มแรกเกิดเป็นจุดช้ำฉ่ำน้ำสีเขียวหม่น ต่อมาขยายเป็นแผลค่อนข้างกลมหรือกลมรี เนื้อเยื่อยุบต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย ขอบแผลไม่เด่นชัด บนแผลจะพบกลุ่มโคนิเดียของราลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้มอมชมพู อยู่บนตุ่มแข็ง (acervulus) สีน้ำตาลถึงสีดำขนาดเล็กที่เรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น บนก้านดอกจะพบแท่งสีดำ (setae) ที่บริเวณแผล
แหล่งที่พบ	อ.ยางชุมน้อย จ.ศรีสะเกษ อ.ด่านมะขามเตี้ย จ.กาญจนบุรี

พืชอาศัย	หอมต้นหรือหอมแบ่ง (Shallot ; *Allium ascalonicum* L.) หอมหัวใหญ่ (Onion ; *Allium cepa* L.) หอมแดงหรือหอมหัว (Multiplier onion ; *Allium cepa* var.*aggregatum*)
ชื่อโรค	หอมเลื้อย (onion twister)
ลักษณะอาการ	ต้น ใบ โคนกาบใบ คอหรือส่วนหัว เกิดแผลรูปร่ี เนื้อเยื่อของแผลยุบตัวต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย บนแผลจะพบกลุ่มโคนิเดียของราเป็นของเหลวข้นสีส้มอมชมพู อยู่บนตุ่มแข็งสีน้ำตาลถึงสีดำขนาดเล็กที่เรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น นอกจากนี้ต้นพืชจะเกิดอาการแคระแกร็นไม่ลงหัว หรือหัวลีบยาว บิดโค้งงอ ใบบิดเป็นเกลียว ส่วนคอยืดยาวและมีระบบรากสั้นกว่าปกติ

แหล่งที่พบ อ.ด่านมะขามเตี้ย จ.กาญจนบุรี
อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่

มีรายงานเกี่ยวกับโรคหอมเลื้อยว่าเป็นโรคที่สำคัญ ระบาดทำความเสียหายมากในฤดูฝน เกิดโรครุนแรงกับหอมหัวใหญ่ เกิดโรคปานกลางกับหอมแดงและหอมแบ่งที่ปลูกเพื่อทำหัวพันธุ์ เป็นโรคเดียวกับโรคใบเน่าแอนแทรกโนส รานี้ทำให้เกิดอาการใบเน่าและอาการเลื้อยไม่ลงหัวด้วย สำหรับกุยช่ายจะเป็นโรคใบเน่าแอนแทรกโนสแต่ไม่แสดงอาการเลื้อย (นิตยา, 2545)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร PDA เส้นใยเจริญหนาแน่นเหมือนกำมะหยี่สีเทา สีด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทาแก่ ไม่พบ setae และ sclerotia โคนิเดียเดี่ยวๆรูปร่างทรงกระบอก ปลายมนทั้งสองด้าน ไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น ขนาดที่วัดได้ 3.89-5.2 x 14.5-23.5 ไมครอน แอพเพรสซอเรียมีรูปร่างคล้ายกระบอง สีน้ำตาล ขอบหนาสีน้ำตาลเข้ม ขนาดที่วัดได้ 5.2-12.5 x 8.4-18.5 ไมครอน

พืชอาศัย พริกไทย (Pepper; *Piper nigrum* Linn.)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ ใบ มีอาการแห้งตาย โดยเฉพาะใบแก่ อาการเริ่มแรกปลายใบหรือขอบใบจะแห้งเป็นสีน้ำตาล และลุกลามเข้ามาถึงกลางใบ กลางแผลมีเม็ดแข็งสีดำเท่าหัวเข็มหมุดขนาดเล็กเกิดเรียงเป็นแถวซ้อนกันหลายชั้น

แหล่งที่พบ อ.พลิ้ว และ อ.เมือง จ.จันทบุรี

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร PDA เส้นใยเจริญฟู แต่ไม่หนาแน่น สีขาวเทา สีด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทาอ่อน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ จะเห็นโคนิเดียรวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะคล้ายหยดน้ำข้นๆ สีเหลืองอมส้ม เกิดเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้นๆ โคนิเดียเดี่ยวๆรูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน ไม่มีสี เซลล์เดียว มี guttulate อยู่ภายใน ขนาดที่วัดได้ 2.59-5.18 x 12.95-20.72 ไมครอน ลักษณะแอพเพรสซอเรีย บนอาหาร PCA มีรูปร่างแบบกระบอง หรือไม่แน่นอน บางอันขอบเรียบ บางอันมี รอยหยัก (lobe) สีน้ำตาล ขอบหนาสีน้ำตาลเข้ม ขนาดที่วัดได้ 3.89-6.48 x 5.18-14.25 ไมครอน

พืชอาศัย ยางพารา (Para rubber; *Hevea braziliensis* Muell.Agr.)

ชื่อโรค ใบจุดนูนและใบร่วง (Colletotrichum leaf spot and leaf fall)

ลักษณะอาการ ใบ บนใบอ่อนอายุ 5-15 วัน ใบที่ถูกทำลายจะบิดเบี้ยวผิดปกติ ต่อมาจะหลุดร่วง และมีอาการตายลุกลามจากยอด อาการบนใบที่เริ่มเปลี่ยนสีจากสีทองแดงเป็นสี

เขียว จะเกิดจุดแผลสีน้ำตาล มีโซนเหลืองล้อมรอบ จุดแผลมีลักษณะนูนมาทางด้านหน้าของใบ

แหล่งที่พบ อ.ห้วยยอด และ อ.สิเกา จ.ตรัง

กิ่งอำเภอรัตนวาปี จ.หนองคาย

รา *C. gloeosporioides* ที่แยกจากใบยางพาราที่มีลักษณะอาการดังกล่าว มีลักษณะคล้ายกับที่พัฒนาและคณะ (2534) รายงานไว้ แต่พบว่าขนาดของโคนิเดียมีความแตกต่างกันเล็กน้อย พัฒนาและคณะรายงานไว้ว่าโคนิเดียเดี่ยวๆ ไม่มีสีหรือสีใส รูปร่างทรงกระบอก หัวท้ายมน เซลล์เดียว มี guttulate อยู่ภายใน ขนาด 3.0-4.0 x 9.0-24.0 ไมครอน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร PDA เส้นใยเจริญหนาแน่นเหมือนกำมะหยี่สีขาวเทา สีด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทา ไม่พบ setae และ sclerotia เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่ จะเห็นโคนิเดียรวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะคล้ายหยดน้ำข้นๆสีส้ม โคนิเดียเดี่ยวๆ รูปร่างทรงกระบอก ปลายมนทั้งสองด้าน ไม่มีสี ไม่มีผนังกั้น มี guttulate อยู่ภายใน ขนาดโคนิเดียที่วัดได้ 2.59-7.77 x 7.77-20.72 ไมครอน ลักษณะแอพเพรสซอเรียบนอาหาร PCA รูปร่างคล้ายกระบองถึงรูปร่างไม่แน่นอน สีน้ำตาล ขอบหนาสีน้ำตาลเข้ม บางอันขอบเรียบ บางอันมี รอยหยัก (lobe) ขนาดที่วัดได้ 2.59-7.77 x 3.89-15.54 ไมครอน

พืชอาศัย องุ่น (Grape*; Vitis vinifera* L.)

ชมพู่ (Rose apple*; Eugenia javanica* Lamk.)

ฝรั่ง (Guava; *Pisum sativum* L.)

มะละกอ (Papaya; *Carica papaya* L.)

กาแฟ (Arabian coffee;*Coffea arabica* L.)

(Robusta coffee;*Coffea robusta* L.)

มะม่วง (Mango; *Mangifera indica* L.)

อโวกาโด (avocado; *Persea Americana* Mill.)

ชื่อโรค ผลเน่าแอนแทรกโนส (anthracnose fruit rot)

ลักษณะอาการ **ฝรั่ง องุ่น ชมพู่ มะละกอ** ผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยว เกิดแผลช้ำฉ่ำน้ำ รูปร่างแผลค่อนข้างกลม จนถึงไม่แน่นอน สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลแดง บนผลฝรั่งขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม ส่วนบนผลองุ่น ชมพู่ มะละกอ ขอบแผลไม่ชัดเจน เนื้อเยื่อพืชตรงกลางแผลจะยุบเป็นแอ่งบุ๋ม ถ้าความชื้นสูงจะพบกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีครีม หรือสีส้มเกิดอยู่บนตุ่มแข็งเล็กๆ สีครีม หรือสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ที่เรียงซ้อนกันเป็นวง บริเวณกลางแผล

กาแฟ อโวกาโด ผลแก่จัดหรือเกือบสุก เริ่มแรกจะเกิดจุดค่อนข้างกลมสีน้ำตาลแก่ถึงสีดำ ต่อมาจะขยายเป็นแผลขนาดใหญ่ เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย ขอบแผลไม่ชัดเจน ผลที่เป็นโรครุนแรงแผลจะขยายติดต่อกันจนผลเป็นสีดำทั้งผล บนผลอโวกาโดแผลมักเกิดรอยแตกและถ้าความชื้นสูงก็จะพบโคนิเดียเป็นเมือกเยิ้มสีส้มอมชมพู

มะม่วง ใบอ่อนเกิดจุดแผลเล็กๆ สีเหลืองอ่อน ลักษณะฉ่ำน้ำ เมื่อขยายใหญ่จะเห็นเป็นจุดแผลสีน้ำตาลรูปร่างไม่แน่นอน เนื้อเยื่อตรงกลางแผลฉีกขาด ใบที่อ่อนมากๆแผลจะขยายตัวอย่างรวดเร็ว ทำให้ใบแห้งหรือบิดเบี้ยวเสียรูปทรง ถ้าความชื้นสูงจะพบกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้มกระจายอยู่บริเวณกลางแผล อาการบนผลที่แก่จัดหรือผลสุก เริ่มจากจุดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำรูปร่างกลมขนาดไม่แน่นอน แล้วขยายเป็นแผลใหญ่ค่อนข้างกลมสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย ตรงกลางแผลอาจพบเม็ดแข็งเล็กๆ สีดำเรียงเป็นวงซ้อนกันเป็นชั้น และมีกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นของเหลวข้นสีส้มกระจายอยู่

แหล่งที่พบ มะม่วง อ.เมือง อ.แม่สาย และ อ.แม่สรวย จ.เชียงราย
อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ , อ.ลี้ จ.ลำพูน
อ.ปัว จ.น่าน , อ.บางมูลนาก จ.พิจิตร
อ.บางคล้า และ อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา
อ.กบินทร์บุรี จ.ปราจีนบุรี
อ.ปากช่อง และ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
อ.บ้านไผ่ จ.ขอนแก่น, อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ
อ.เมือง และ อ.ปากเกร็ด จ.นนทบุรี, อ.ลาดหลุมแก้ว จ.ปทุมธานี อ . ศรีประจันต์ จ.สุพรรณบุรี, เขตบางบัว กรุงเทพฯ
อ.พลิ้ว จ.จันทบุรี

กาแฟ อ.นาสิก จ.ชุมพร, อ.เมือง จ.สกลนคร, อ.ขุนวาง จ.เชียงใหม่

อโวกาโด อ.เมือง จ.ตาก

ชมพู่ อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี, อ.สามพราน จ.นครปฐม
อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี, อ.สามโคก จ.ปทุมธานี
อ.บางมูลนาก จ.พิจิตร

องุ่น อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย, อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร

ฝรั่ง อ.เมือง จ.พิจิตร, อ.เมือง จ.นครพนม, เขตบางบัว กรุงเทพฯ

มะละกอ อ.หนองหญ้าปล้อง จ.เพชรบุรี, อ.พลิ้ว จ.จันทบุรี

อ.พบพระ จ.ตาก, อ.เมือง จ.นครนายก, อ.วังม่วง จ.ลพบุรี

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา บนอาหาร PDA เส้นใยเจริญฟู และหนาแน่น สีขาวถึงเทาอ่อน ด้านตรงข้ามโคโลนีสีเทาอ่อน ไม่สร้าง setae และ sclerotia เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่โคนิเดียจะรวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะคล้ายหยดน้ำข้นๆ สีส้มอมชมพู โคนิเดียเดี่ยวๆ รูปร่างทรงกระบอก ปลายมนทั้งสองด้าน ไม่มีสี เซลล์เดียว มี guttule ขนาดที่วัดได้ 2.59-5.18 x 10.36-23.31 ไมครอน แอพเพรสซอเรียบนอาหาร PCA ที่ได้จากการเลี้ยงแบบ slide culture มีรูปร่างค่อนข้างกลมถึงรูปกระบอง หรือรูปร่างไม่แน่นอนมีรอยหยัก (lobe) สีน้ำตาลขอบหนาสีน้ำตาลเข้ม ขนาดที่วัดได้ 5.18-7.77 x 6.48-31.08 ไมครอน

ชื่อพืช หน่อไม้ฝรั่ง (Asparagus; *Asparagus officinalis* L.)

กุหลาบ (Rose; *Rosa hybrida*)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ อาการที่ลำต้น เริ่มแรกจะเกิดเป็นจุดช้ำฉ่ำน้ำสีเขียวหม่น ต่อมาจะขยายเป็นแผลรูปรี เนื้อเยื่อพืชตรงกลางแผลสีขาวซีดและยุบต่ำกว่าระดับเดิมเล็กน้อย ขอบแผลไม่เด่นชัด เนื้อเยื่อพืชรอบๆแผลมีลักษณะฉ่ำน้ำสีเขียวเข้ม บนแผลจะพบ setae และกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นของหยดของเหลวข้นสีส้มอมชมพู อยู่บนตุ่มแข็งขนาดเล็ก สีน้ำตาลถึงสีดำที่เรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้น เมื่อแผลขยายใหญ่และยาวไปตามความยาวของลำต้นมากขึ้น ต้นพืชจะลีบแห้ง ใบเหลืองและตายในที่สุด

แหล่งที่พบ หน่อไม้ฝรั่ง อ.ท่าม่วง และ อ.ด่านมะขามเตี้ย จ.กาญจนบุรี

อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี

กุหลาบ กิ่งอำเภอสว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี

ชื่อพืช มะขามเทศ (Manila Tamarind*; Pithecellabium dulce* (Roxb.) Benth

(มะขามเทศพันธุ์สีชมพู)

ชื่อโรค แอนแทรกโนส (anthracnose)

ลักษณะอาการ ฝัก อาการเกิดทั้งบนฝักอ่อนและฝักแก่ เริ่มแรกเกิดเป็นจุดสีน้ำตาล แล้วขยายใหญ่ ขอบแผลไม่เด่นชัด ไม่มีโซนเหลืองล้อมรอบ มี acervulus เป็นจุดสีดำขนาดเล็กเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ

แหล่งที่พบ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

พืชอาศัย	พริกขี้หนู (Bird Chili; *Capsicum frutescens*)
	พริกชี้ฟ้า (Chili Spur Pepper;*Capsicum annuum* L.var. *acuminatum* Fingerh.)
ชื่อโรค	แอนแทรกโนส(anthracnose) , กุ้งแห้ง
ลักษณะอาการ	ผลพริกที่เริ่มสุก เกิดจุดฉ่ำน้ำขนาดเล็ก แผลบุ๋มลึกลงเล็กน้อย ต่อมาแผลขยายใหญ่เป็นรูปวงรี ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลไม่ชัดเจน มีตุ่มแข็งเล็กๆสีดำเรียงซ้อนกันเป็นวงหลายชั้นที่บริเวณแผล ถ้าความชื้นสูงบนตุ่มแข็งเล็กๆจะมีกลุ่มโคนิเดียลักษณะเป็นหยดของเหลวข้นสีส้มเกิดขึ้น
แหล่งที่พบ	อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม อ.เฉลิมพระเกียรติ จ.บุรีรัมย์ อ.ขุขันธ์ และ อ.ขุนหาญ จ.ศรีสะเกษ อ.แม่อาย อ.สันทราย อ.แม่แจ่ม และ อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่ อ.เมือง จ.ลำพูน อ.แก่งกระจาน จ.เพชรบุรี อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร อ.เมือง จ.พิจิตร อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา อ.เมือง จ.สกลนคร อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี อ.สิเกา จ.ตรัง

พืชอาศัย	หน้าวัว (Anthurium; *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre)
	ดาหลา (Torch Ginger; *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith)
ชื่อโรค	แอนแทรกโนส (anthracnose)
ลักษณะอาการ	**หน้าวัว** ใบ เริ่มแรกเกิดแผลฉ่ำน้ำเล็กๆ มีโซนเหลืองล้อมรอบ ต่อมาแผลจะขยายเป็นแผลค่อนข้างกลม ขอบแผลรูปร่างแน่นอน ตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อน ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม มีจุดสีดำขนาดเล็กฝังเรียงเป็นวงซ้อนกัน อาจพบกลุ่มโคนิเดียเป็นหยดสีส้มอ่อนๆบนจุดดำเหล่านี้ **ดาหลา** กลีบเลี้ยง กลีบดอก แผลสีน้ำตาลแดง ขอบแผลไม่ชัดเจน เนื้อเยื่อบริเวณแผลยุบตัวลงเล็กน้อย มีจุดสีดำขนาดเล็กฝังเรียงเป็นวงซ้อนกันที่บริเวณแผล
แหล่งที่พบ	หน้าวัว อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ ดาหลา อ.คลองใหญ่ จ.ตราด

สรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *Colletotrichum* สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของไม้ผลและพืชเศรษฐกิจเท่าที่เก็บรวบรวมได้ระหว่างปี พ .ศ. 2544-2546 จำนวน 110 ไอโซเลท อธิบายลักษณะและจำแนกชนิดของรา *Colletotrichum* ได้ 5 ชนิด คือ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ ฝรั่ง มะละกอ ชมพู่ มะม่วง องุ่นสตรอเบอร์รี่ อโวกาโด มะขามเทศ กาแฟ ยางพารา หอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ กุยช่าย พริกไทย หน่อไม้ฝรั่ง พริก หน้าวัว กล้วยไม้ ดาหลา และกุหลาบ *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl. & Bisby เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ พริก และมะละกอ *Colletotrichum circinans* (Berk.) Vogl. เป็น สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของหอมแบ่ง *Colletotrichum acutatum* Simmonds เป็น สาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ พริก และสตรอเบอร์รี่ *Colletotrichum truncatum* (Schr.) Andrus & Moore เป็นสาเหตุโรคแอนแทรกโนสของ ถั่วเหลือง และถั่วแดงหลวง

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2528. รวบรวมและจำแนกเชื้อราต่างๆที่ เป็นสาเหตุโรคมะละกอ. น.102-127*ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์, วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2538. ศึกษาเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของฝรั่ง. น.5-10 *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2538 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

พัฒนา สนธิรัตน, วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ และ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี. 2534. ศึกษาเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคยางพาราในประเทศไทย. น.17-28. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2534. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

นิตยา กันหลง. 2545. โรคใบเน่าหรือแอนแทรกโนส. *ใน* เอกสารวิชาการโรคสำคัญของพืชสกุลหอมกระเทียมในประเทศไทย. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

นิตยา กันหลง, พัน อินทร์จันทร์ และลักษณา วรรณภีร์. 2533. โรคแอนแทรกโนสและโรคใบแห้ง โรคที่เป็นปัญหาใหม่ของกระเทียม. วารสารเคหะการเกษตร 14(4):161-164.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์.2546. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม. 351 หน้า.

วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และ พัฒนา สนธิรัตน. 2528. *Colletotrichum* spp. ในประเทศไทย. น.128-140. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Denoyes B, Baudry A. 1995. Species Identification and Pathogenicity Study of French Colletotrichum Strains Isolated from Strawberry Using Morphological and Cultural Characters. Phytopathology. 85:53-57.

Holliday, P.1980. Fungus Diseases of Tropical Crops. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 607 p.

Maas JL, ed. 1984. Compendium of Strawberry Disease. St Paul, MN: American Phytopathological Society. 138 p.

Mordue, J.E.M. 1967. CMI.Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No.133.

Mordue, J.E.M. 1971. CMI.Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No.317.

Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata. CMI. Kew Surrey, England. 695 p.

Walker, J.C. 1921. Onion Smudge. J. Agric. Res. 20:685-772.

วิธีการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* สาเหตุโรคสแคปขององุ่น

Preservation of *Sphaceloma ampelinum* the Causal Agent of Grape Scab Disease

ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี **พัฒนา สนธิรัตน**

อภิรัชต์ สมฤทธิ์ **ธารทิพย ภาสบุตร**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

วิธีการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* โดยวิธีเก็บรักษา 4 กรรมวิธี ได้แก่ เก็บรักษาบนอาหาร PDA เก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80°ซ พบว่าทั้ง 4 กรรมวิธี สามารถเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ให้มีชีวิตอยู่รอดได้ 24 เดือน แต่การเก็บรักษาบนอาหาร PDA มีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียอื่น หลังจากเก็บรักษา 1 ปีขึ้นไป ส่วนการเก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80°ซ และเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* สามารถมีชีวิตอยู่ได้และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย การเจริญของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* พบว่าวิธีการเก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เป็นวิธีที่ดีที่สุด รองลงมาได้แก่การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80°ซ ตามลำดับ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 4411010009

คำนำ

องุ่น เป็นไม้ผลเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย ทำรายได้ให้เกษตรกรผู้ปลูกอย่างมาก แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาการแพร่ระบาดของโรคต่างๆ ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นเนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายในการป้องกันกำจัดโรคเป็นจำนวนมาก โรคที่สำคัญขององุ่นส่วนใหญ่มีสาเหตุจากเชื้อรา โรคสแคปหรือ อีบุบ เป็นโรคสำคัญชนิดหนึ่งที่เกิดจากเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* สามารถทำลายองุ่นได้ทุกส่วนทั้ง ใบ ผล เถาองุ่น โดยจะรุนแรงในส่วนของพืชที่ยังอ่อนอยู่ เช่น ผลอ่อน เถาอ่อน เป็นต้น ส่วนของใบที่เป็นโรคจะแสดงอาการเป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้ม ต่อมาแผลขยายขนาดขึ้นตรงกลางแผลสีน้ำตาลอ่อนหรือเทา บางครั้งเนื้อเยื่อใบหลุดออกไป หากเป็นเส้นกลางใบจะเป็นแผลสีน้ำตาลเข้มบุ๋มลึก ใบม้วนลงด้านล่าง ถ้ารุนแรงใบอาจร่วงได้ ส่วนของผลที่เป็นโรคจะมีจุดสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้มถึงดำ แผลบุ๋มและแห้งแข็ง เถาองุ่นที่เป็นโรค เชื้อจะเข้าทำลายยอดอ่อนก่อนทำให้บิดงอและแผลปุ่มปม เป็นรุนแรงทำให้แห้งตายได้

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเพื่อให้ทราบวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม ทั้งนี้เพราะการเก็บรักษาเชื้อรา มีจุดมุ่งหมายเพื่อเก็บเชื้อราให้มีชีวิตอยู่และสามารถนำกลับมาใช้ได้ โดยเชื้อยังคงบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น เช่น เชื้อราหรือแบคทีเรีย เพื่อที่จะทำการศึกษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เพิ่มเติมได้ วิธีการเก็บรักษาที่ใช้กันอยู่มีหลายวิธี บางวิธีเหมาะสำหรับการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น เช่น การเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารแห้งก็ต้องมีการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่ วิธีการเช่นนี้ไม่ยุ่งยาก แต่เสียเวลาและมักพบการปนเปื้อนของเชื้อได้ง่าย อีกทั้งยังทำให้คุณภาพของเชื้อเสื่อมลง บางวิธีสามารถเก็บรักษาได้นาน เช่น การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อัจฉราและประไพศรี (2543) ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อเห็ดฟางในน้ำกลั่นและพบว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อเห็ดฟางให้มีชีวิตอยู่รอดและคงลักษณะเดิม ยังมีการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อเห็ดและพบว่าสามารถเก็บเชื้อได้ดีที่อุณหภูมิ -80°ซ -85°ซ และ -196°ซ (Ito and Yokoyama, 1983) สุวลักษณ์และประไพศรี (2545) ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมและเห็ดหูหนู พบว่าการเก็บรักษาโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง ในน้ำมันแร่นึ่งฆ่าเชื้อ และการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -75°ซ สามารถเก็บรักษาเชื้อเห็ดได้ 24 เดือน Claudia และคณะ (2545) รายงานว่าเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้โดยการเก็บรักษาด้วยวิธีเก็บในน้ำกลั่น ในน้ำมันแร่ และเก็บที่อุณหภูมิ -80°C ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เพื่อที่จะได้วิธีการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพ สามารถเก็บได้นานและคงคุณภาพของเชื้อราดังกล่าว เพื่อการนำเชื้อไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สิ่งที่ใช้ในการทดลอง
   1.1 เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้จากองุ่นที่เป็นโรค เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการทดสอบ
   1.2 กล้องจุลทรรศน์
   1.3 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิต่ำ
   1.4 เครื่อง Freeze – Dryer และตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ
   1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA
   1.6 อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
2. แบบและวิธีการทดลอง
   2.1 แบบการทดลอง
      วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ
   2.2 กรรมวิธี
      1. เก็บโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
      2. เก็บโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
      3. เก็บโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization)
      4. เก็บใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80^{o} ซ
   2.3 วิธีปฏิบัติการทดลอง
      2.3.1 เก็บตัวอย่างองุ่นที่เป็นโรคสแคป นำมาแยกสปอร์เดี่ยวของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* โดยการเขี่ยสปอร์เดี่ยวจากแผลบนผลองุ่น ลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25^{o} ซ
      2.3.2 เมื่อเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อที่แยกได้เลี้ยงบนอาหาร PDA
      2.3.3 การเก็บเชื้อทำโดยการเจาะอาหารที่มีเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เจริญเต็มด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ย้ายชิ้นวุ้นเก็บโดยวิธีต่างๆ ดังนี้
         - บนอาหาร PDA slant เมื่อเชื้อเจริญดีเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิต่ำ
         - เก็บใน 10% glycerine suspending medium ในสภาพเย็นจัด – 80^{o} ซ
         - เก็บด้วยวิธี Lyophilization

- เก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

2.4 การบันทึกข้อมูล

2.4.1 ความมีชีวิตของเชื้อ ทุก 6 เดือน นำเชื้อราที่เก็บไว้ด้วยวิธีการต่างๆ เลี้ยงบนอาหาร PDA บันทึกการเจริญเติบโตของเชื้อว่ามีการเจริญเติบโตหรือไม่

2.4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อ นำเชื้อราที่เก็บไว้ด้วยวิธีการต่างๆ ที่อายุการเก็บรักษา 6, 12, 18 และ 24 เดือน เลี้ยงบนอาหาร PDA เปรียบเทียบลักษณะการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อบนอาหาร PDA ในแนวระดับ 2 แนวตั้งฉากกัน เมื่อเลี้ยงบน PDA 30 วัน

เวลาและสถานที่

เริ่มดำเนินการทดลองตั้งแต่ ตุลาคม 2543 สิ้นสุด กันยายน 2546 ดำเนินการทดลองที่กลุ่มงานวิทยาไมโค สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบผลการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บไว้ในสภาพต่างๆ ได้แก่ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนอาหาร PDA PCA เก็บแห้งสุญญากาศ และเก็บใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ ที่ระยะเวลาเก็บ 6, 12, 18 และ 24 เดือน ได้ผลดังนี้

1. **ความมีชีวิตของเชื้อ** พบว่า ระยะเวลาเก็บที่ 6 เดือน เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บ บนอาหาร PDA เก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) และเก็บใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรินที่อุณหภูมิ -80° ซ และเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เชื้อราสามารถมีชีวิตอยู่ได้ หลังจากเลี้ยงเชื้อไว้ในระยะเวลา 12 เดือน เชื้อราที่เก็บบนอาหาร PDA สามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ในขณะที่เชื้อราที่เก็บด้วยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรินที่อุณหภูมิ -80° ซ และเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ สามารถมีชีวิตอยู่ได้และไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ที่ระยะเวลา 18 เดือน และ 24 เดือน พบว่าได้ผลเช่นเดียวกันกับที่เก็บระยะเวลา 12 เดือน
2. **การเจริญเติบโตของเชื้อรา**
   2.1. **ที่ระยะเวลา 6 เดือน** เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เจริญเติบโตดีที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.22 ซม. ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับวิธีการเก็บรักษาอื่นๆ รองลงมาได้แก่ วิธีเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนอาหาร PDA

และใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรินที่อุณหภูมิ -80° ซ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.88, 2.82 และ 2.78 ซ.ม. ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 วิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1)

2.2. **ที่ระยะเวลา 12 เดือน** เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บรักษาโดยวิธีเลี้ยงในอาหาร PDA พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์สถิติเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นได้ ส่วนการเก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เจริญเติบโตดีที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.16 ซ.ม. มีความแตกต่างทางสถิติกับ วิธีเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.82 และ 2.78 ซ.ม. ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 วิธีการไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1)

2.3. **ที่ระยะเวลา 18** วิธีการเก็บบนอาหาร PDA มีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรีย ตั้งแต่ที่ระยะเวลา 12 เดือน ไม่สามารถเปรียบเทียบผลทางสถิติได้ จึงทำการเปรียบเทียบเฉพาะวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* โดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และ เก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอรินที่อุณหภูมิ -80° ซ พบว่าผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บรักษาโดยวิธีต่างๆ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่อายุการเก็บรักษา 12 เดือน โดยพบว่าวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เจริญเติบโตดีที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.42 ซ.ม. ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับอีก 2 วิธี รองลงมาได้แก่ วิธีเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.02 ซ.ม. และใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.87 ซ.ม. ซึ่ง 2 วิธีการหลังนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1)

2.4. **ที่ระยะเวลา 24 เดือน** ทำการเปรียบเทียบผลการเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* โดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ และพบว่าผลการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บรักษาโดยวิธีต่างๆ เป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่อายุการเก็บรักษา 12 และ 18 เดือน โดยพบว่าวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เจริญเติบโตดีที่สุด มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 3.04 ซ.ม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ วิธีเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.62 ซ.ม. แต่แตกต่างทางสถิติกับการเก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย 2.14 ซ.ม. (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความมีชีวิตและการเจริญของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* เก็บรักษาโดยวิธีต่างๆ ที่ระยะเวลา 6, 12, 18 และ 24 เดือน

ระยะเวลาเก็บรักษา (เดือน)								
	6		12		18		24	
กรรมวิธีที่เก็บรักษา	% ความมีชีวิต	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซ.ม.)	% ความมีชีวิต	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซ.ม.)	% ความมีชีวิต	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซ.ม.)	% ความมีชีวิต	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ย (ซ.ม.)
1	100	2.82 b	100	-	100	-	100	-
2	100	2.78 b	100	2.78 b	100	2.87 b	100	2.14 b
3	100	3.22 a	100	3.16 a	100	3.42 a	100	3.04 a
4	100	2.88 b	100	2.82 b	100	3.02 b	100	2.62 a
CV (%)		4.29		4.05		6.27		11.73

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT)

กรรมวิธีที่ 1 = เก็บรักษาบนอาหาร PDA

กรรมวิธีที่ 2 = เก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80^{o} ซ

กรรมวิธีที่ 3 = เก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization)

กรรมวิธีที่ 4 = เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนซ้ำของเชื้อราที่เจริญ}}{\text{จำนวนซ้ำของเชื้อราทั้งหมด}} \times 100$$

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเก็บรักษาเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* โดยวิธีเก็บรักษา 4 กรรมวิธี ได้แก่ เก็บรักษาบนอาหาร PDA เก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ แล้วตรวจสอบความมีชีวิตและการเจริญของเชื้อรา พบว่า

เชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* ที่เก็บรักษาทั้ง 4 กรรมวิธี เป็นเวลา 24 เดือน สามารถมีชีวิตอยู่ได้ แต่การเก็บรักษาบนอาหาร PDA พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียอื่น หลังจากเก็บรักษา 1 ปีขึ้นไป ส่วนการเก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เก็บใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ และเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เชื้อราสามารถมีชีวิตอยู่ได้และไม่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียเลยจนถึงอายุการเก็บรักษา 24 เดือน

การเจริญของเชื้อรา *Sphaceloma ampelinum* พบว่าวิธีการเก็บรักษาโดยวิธีเก็บแห้งสุญญากาศ (Lyophilization) เป็นวิธีที่ดีที่สุด รองลงมาได้แก่การเก็บรักษาในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บรักษาใน 10 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน ที่อุณหภูมิ -80° ซ ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

สุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน. 2545. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ดสกุลนางรมและเห็ดหูหนู. หน้า 8-9. ใน : เอกสารสรุปผลการดำเนินงาน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2545. วันที่ 16-18 กันยายน 2545. ณ โรงแรมภูพิมานรีสอร์ท จ. นครราชสีมา.

อัจฉรา พยัพพานนท์ และ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน. 2543. การมีชีวิตรอดของเชื้อเห็ดฟางในน้ำกลั่น. หน้า 37. ใน : บทคัดย่อและสรุปผลการดำเนินงาน ประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2543. วันที่ 8-10 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมลองบีช จ. เพชรบุรี.

Ito, T. and T. Yokoyama. 1983. Preservation of basidiomycete cultures by freezing. *IFO Res. Comm.* 11: 60-70.

Claudia C. López Lastra, Ann E. Hajek and Richard A. Humber. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. Can. J. Bot./Rev. Can. Bot. 80(10): 1126-1130. In : http://pubs.nrc-cnrc.gc.ca/cgi- bin/rp/rp2_abst_e?cjb_b02-090_80_ns_nf_cjb

รวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Fusarium* สาเหตุโรคชนิดต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจ

Collection and Identification of Pathogenic *Fusarium* on Economic Crops

อภิรัชต์ สมฤทธิ์ **พัฒนา สนธิรัตน**

นิยม ไข่มุกข์ **ธารทิพย ภาสบุตร**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

การรวบรวมและจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Fusarium* สาเหตุโรคชนิดต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจจากแหล่งปลูกพืชในท้องที่บางจังหวัดของประเทศไทย ระหว่างเดือน ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546 จำนวน 88 ไอโซเลท สามารถจำแนกรา *Fusarium* ที่พบได้ 7 ชนิด (species) 8 formae speciales (f. sp.) ได้แก่ *F. graminearum* จากโรค ear scab ของข้าวสาลี *F. moniliforme* จากโรคลำต้นเน่าของข้าวโพด *F. proliferum* จากโรคถอดฝักดาบของข้าว และ โรคใบจุดและใบไหม้ของเอื้องพร้าว *F. semitectum* จากโรคเมล็ดด่างของข้าว *F. solani* จากโรคเน่าตายของถั่วเหลือง โรค black spot ของหัวมันฝรั่ง และ โรคโคนเน่าของมะเขือเปราะ *F. subglutinans* จากโรคเหี่ยวของอ้อย และ *F. oxysporum* จำนวน 8 formae speciales ได้แก่ *F. oxysporum f.* sp. *asparagi* จากโรคเหี่ยวของหน่อไม้ฝรั่ง *F. oxysporum* f. sp. *cubense* จากโรคเหี่ยวหรือโรคตายพรายของกล้วย *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* จากโรคหัวเน่าของแกลดิโอลัส *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* จากโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* จากโรคเหี่ยวของถั่วลันเตา *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* จากโรคเหี่ยวของถั่วฝักยาว *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* จากโรคเหี่ยวของฝ้าย และ *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* จากโรคเหี่ยวของขิง การเก็บรักษาเชื้อราสกุล *Fusarium* พบว่า ในระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน วิธีการเก็บแบบแห้งแข็งสูญญากาศ (Lyophiliztion) เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีที่สุด ส่วนวิธีการเก็บในกลีเซอรีน 10% ที่อุณหภูมิ – 80°ซ. เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีรองลงมา ซึ่งดีกว่าวิธีการเก็บแบบแห้งบนกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. และเก็บแห้งในดินสวน ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ.

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 4411010003

คำนำ

รา *Fusarium* Fries เป็นราจัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina, form–class Hyphomycetes, form–order Tuberculariales, form-family Tuberculariaceae (Ainsworth, 1973) ลักษณะโดยทั่วไป คือสร้างเส้นใย สปอร์หรือโคนิเดียม (conidium) สร้างก้านสปอร์หรือ coniniophore ที่ไม่มีสีหรือมีสีอ่อน และอาจสร้างหรือไม่สร้าง sporodochium เซลล์ที่สร้างสปอร์ sporogenous cell เรียกว่า phialide มีทั้งแบบมีช่องเปิด 1 ช่อง (monophialide) และ แบบมีช่องเปิดมากกว่า 1 ช่อง (polyphialide) phialide เกิดโดยตรงบนเส้นใยเจริญ (vegetative hyphae) หรือเกิดบนก้านชูสปอร์ phialospore มี 2 แบบ คือ macroconidium ขนาดใหญ่มี 1 หรือหลาย septate ไม่มีสี รูปร่างเรียวยาว อาจมีลักษณะโค้ง และมักมีรูปร่างแบบเรือ เซลล์ล่างมี foot cell หรือมีลักษณะเป็นติ่ง (knob) ส่วน macroconidium มักเกิดเป็นกลุ่มมีสารเมือก (mucous) ทำให้สปอร์เกาะอยู่รวมกันอย่างหลวม microconidium มีขนาดเล็ก ไม่มีผนังกั้น หรือมี 1 septate ไม่มีสี รูปร่างกลม รี หรือทรงกระบอก เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่ หรือเกิดรวมกันเป็นกลุ่ม (false head) เชื้อราสกุลนี้อาจสร้างหรือไม่สร้าง chlamydospore ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อราสร้าง pigment ลงสีอาหารได้หลายสี ตั้งแต่สีขาว ครีม ส้ม ส้มอมชมพู ชมพูอมม่วง ม่วง น้ำเงิน น้ำตาล และ สีแดง carmine red ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของ *Fusarium* บางชนิดสร้างเม็ด sclerotium ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ฯลฯ เมื่อมีอายุมากกว่า 15 วัน (Barron, 1977)

ระยะการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (teleomorph) ทั้งหมดอยู่ใน Order Hypocreales, sub-class Ascomycotina (Ainsworth, 1973)

ระบบการจัดจำแนกชนิดของรา *Fusarium* เริ่มมีการศึกษาโดย Wollenweber และ Reinking ในปี ค.ศ.1935 ซึ่งรายงานไว้ทั้งหมด 142 ชนิดใน 16 sections (Domsch และคณะ, 1980) ต่อมาได้มีผู้ศึกษาและเปลี่ยนแปลงการจัดระบบที่แตกต่างกัน ซึ่งบางระบบมีความซับซ้อนทั้งนี้เป็นเพราะเชื้อราสกุลนี้เกิดการผันแปร (variation) หรือการกลายพันธุ์ (mutation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture) ได้ง่าย ในปี ค.ศ. 1983 Nelson และคณะ ได้จัดระบบการจัดหมวดหมู่ของรา *Fusarium* ให้ง่ายต่อการจำแนก โดยนำรายละเอียดต่างๆ ที่มีอยู่ในการจัดจำแนกชื่อชนิดจากหลายๆ ระบบนำมาใช้รวมกัน คัดเลือกเอาส่วนที่ดีที่สุดของแต่ละระบบมาจัดใหม่ และศึกษาเพิ่มเติมจาก culture ที่ได้รวบรวมไว้อีกจำนวนมาก Nelson และคณะ ยังคงจัดเรียง section เช่นเดียวกับ Die Fusarium โดย Wollenweber และ Reinking (Nelson, *et al*.,1983)

Fusarium เป็นราอาศัยในดิน พบ ได้ทั่วไปทุกแห่ง หลายชนิดเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว (Brayford, 1985) โรคสำคัญในต่างประเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* และทำความเสียหายมาก ได้แก่ โรคเหี่ยวในกล้วย (Panama wilt) เกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (Ventura, 1988) โรคสแคบ (scab) ของธัญพืชเมืองหนาว เกิดจาก *F. culmorum, F. graminearum* และ *F. avenaecum* (Zillinsky, 1983) และโรค bakanae ของข้าว เกิดจาก *F. moniliforme* (Ou, 1984) เป็นต้น ในประเทศไทย *Fusarium* ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญแก่พืช

หลายชนิด (พัฒนาและคณะ , 2537) เนื่องจากเชื้อรามีพืชอาศัยจำนวนมากและสามารถดำรงชีพอยู่ในดินได้นานหลายปี เกิดความผันแปร (variation) ได้ง่าย และ เชื้อรานี้หลายชนิดมีการสร้างสารพิษ ดังนั้นการเก็บรวบรวมตัวอย่างและจำแนกชื่อชนิด ของเชื้อรา Fusarium จึงทำให้ทราบการเกิดและการระบาดของโรค แหล่งแพร่กระจาย และได้ culture ของ isolate ต่างๆ ที่จัดจำแนกชื่อชนิดแล้วพร้อมข้อมูลเก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยทางด้านต่างๆ เช่น เปรียบเทียบลักษณะที่อาจผันแปรที่เกิดขึ้น ของเชื้อ ในช่วงปีที่ต่างกัน หรือใช้ศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา เปรียบเทียบการจัดจำแนกทาง DNA กับการจำแนกทางสัณฐานวิทยาเพื่อยืนยันชื่อที่ถูกต้องของเชื้อบางชนิด (species) หรือศึกษาการสร้างสารพิษ รวมถึงการมีประโยชน์อื่นเป็นต้น

วิธีการดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่เกิดจาก *Fusarium* จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Corn Leaf Ager (CLA) และ KCl
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

<u>วิธีการ</u>

1. <u>การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค</u>

   ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเหี่ยว ใบไหม้ โคนเน่า ลำต้นเน่า และโรคที่เกิดบนช่อเมล็ดของธัญพืช เป็นต้น ในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ของประเทศ บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก บันทึกและถ่ายภาพลักษณะอาการของโรค
2. <u>การแยกเชื้อ *Fusarium* จากพืชที่เป็นโรค</u>
   2.1 moist chamber method : นำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรควางลงบนกระดาษกรองในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์ จึงแยกสปอร์จากผิวชิ้นส่วนพืช
   2.2 tissue transplanting method : ตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนเป็นโรคและส่วนปกติ หรือบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของลำต้นและส่วนโคนของพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยว ให้มีขนาด 3 x 3 มม. ทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วย chlorox ความเข้มข้น 10% นาน 3-4 นาที แล้วแต่ขนาดของชิ้นส่วน ย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง ที่ 26-28 °ซ. เมื่อเส้นใยเจริญออกมา ทำการแยกเชื้อลงบนอาหาร เลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

3.1 ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single–spore technique

เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 loop ภายใต้ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ห่วงลวด (loop) ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสปอร์แขวนลอย แล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม

3.2 การจำแนกชนิด

ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Fusarium* และศึกษาการสร้าง pigment, sclerotium และ sporodochium ในอาหาร PDA
- บันทึกลักษณะและวัดขนาดของ conidium, conidiophore บนอาหาร CLA อายุ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้แสง NUV
- บันทึกการสร้าง และลักษณะของ chlamydospore บนอาหาร KCl อายุ 30 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้แสง NUV
- ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

4. การเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium*

เก็บรักษาเชื้อ รา *F.graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. solani* และ *F. subglutinans* บริสุทธิ์ โดยวิธีเก็บแบบแห้งแข็งสูญญากาศ (Lyophilization) เก็บแห้งบนกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. เก็บแห้งในดินสวน ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. และเก็บในกลีเซอรีน 10% ที่อุณหภูมิ – 80°ซ. พร้อมข้อมูลในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ กรมวิชาการเกษตร บันทึกผลการมีชีวิตอยู่รอดและลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ทุก 6 เดือน

ระยะเวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ตุลาคม 2543 – กันยายน 2546

กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชเศรษฐกิจที่เป็นโรคเกิดจากเชื้อรา *Fusarium* จากท้องที่ในจังหวัดและภาคต่างๆ ของประเทศไทยรวม 105 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อรา *Fusarium* จากส่วนที่เป็นโรคโดยวิธี moist chamber และ tissue transplanting ได้เชื้อราสกุล *Fusarium* ทั้งหมด 88 ไอโซเลท

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะของโคโลนีเพื่อจำแนกชนิดตามวิธีการและระบบของ Nelson *et al.* (1983) สามารถจำแนกเชื้อรา *Fusarium* ออกได้ 7 ชนิด และ 8 formae speciales ได้แก่ *F. graminearum* จากโรค ear scab ของข้าวสาลี *F. moniliforme* จากโรคลำต้นเน่าของข้าวโพด *F. proliferum* จากโรคถอดฝักดาบของข้าว และ โรคใบจุดและใบไหม้ของเอื้องพร้าว *F. semitectum* จากโรคเมล็ดด่างของข้าว *F. solani* จากโรคเรื่งตายของถั่วเหลือง โรค black spot ของหัวมันฝรั่ง และ โรคโคนเน่าของมะเขือเปราะ *F. subglutinans* จากโรคเหี่ยวของอ้อย และ *F. oxysporum* จำนวน 8 formae speciales ได้แก่ *F. oxysporum f.* sp. *asparagi* จากโรคเหี่ยวของหน่อไม้ฝรั่ง *F. oxysporum* f. sp. *cubense* จากโรคเหี่ยวหรือโรคตายพรายของกล้วย *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* จากโรคหัวเน่าของแกลดิโอลัส *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* จากโรคเหี่ยวของมะเขือ -เทศ *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* จากโรคเหี่ยวของถั่วลันเตา *F. oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* จากโรคเหี่ยวของถั่วฝักยาว *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* จากโรคเหี่ยวของฝ้าย และ *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* จากโรคเหี่ยวของขิง ตามรายละเอียดดังนี้

1. *Fusarium graminearum* Schwabe

ชื่อพ้อง : *F. roseum* Lk. emend. Snyd. & Hans. 'Graminearum'

F. roseum Lk. emend. Snyd, & Hans. var. *graminearum* (Schwabe) Snyd. & Hans.

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เส้นใยฟู หนาแน่น มีสีขาวชมพู หรือน้ำตาลอ่อน เจริญอย่างรวดเร็ว ความยาวของโคโลนีในหลอดอาหาร มากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน sporodochium บนผิวหน้าวุ้นอาหารมีสีส้ม ชมพูอมส้ม จนถึงสีน้ำตาลแดง สร้างได้ดีเมื่อมีอายุ 1 เดือน ขอบโคโลนีมีสีแดง (carmine red) ขอบนอกสุดมีสีเหลือง โคโลนีด้านใต้วุ้นอาหารมีสีชมพูเข้ม ขอบนอกสีแดง หรือเหลืองอยู่นอกสุด

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : ไม่พบการสร้าง microconidia macroconidia เกิดรวมตัวกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า sporodochium มีรูปร่าง cushion-shaped microconidiophore เป็นแบบ monophialide แตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน ไม่มีสี macroconidia รูปร่างคล้ายเคียว (sickle-shaped) ตรงหรือโค้งเล็กน้อย ส่วนมากผนัง 2 ด้านกลางลำตัวขนานกัน ผนังภายนอกหนา เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) เซลล์ที่ปลายเรียว ปลายสุดหักเข้าเล็กน้อย ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 26-48 x 2.5-3 ไมครอน เชื้อราไม่ค่อยสร้าง chlamydospore ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

พืชอาศัย ข้าวสาลี (*Tritichum aestivum*)

ชื่อโรค โรค ear scab

แหล่งที่พบ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่

ลักษณะอาการ บริเวณ spikelet ของรวงข้าวสาลี มีกลุ่มเส้นใยและสปอร์สีชมพูอมส้ม ขึ้นปกคลุมบนเมล็ดมีแผลสีน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน กระจายทั่วไป บางครั้งลุกลามเกือบเต็มเปลือกของเมล็ด ทำให้เมล็ดลีบ

เชื้อราชนิดนี้ชอบอากาศเย็น ดังนั้นจึงไม่ค่อยพบว่าเป็นปัญหากับการปลูกพืชในประเทศไทย และข้าวสาลีก็มีการปลูกไม่แพร่หลาย แต่ในต่างประเทศเชื้อโรคนี้มีความสำคัญมาก โดยทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรง เชื้อราสร้างสารพิษ (mycotoxin) ที่ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์ หากนำเมล็ดเป็นโรคไปเลี้ยงสัตว์ (Neergaard, 1977) เชื้อราชนิดนี้ไม่ค่อยเปลี่ยนรูปร่างเมื่อเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ซึ่งตรงกับรายงานของ Nelson *et al.* (1983)

2. *Fusarium moniliforme* Sheldon

ชื่อพ้อง : *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg

F. fujikuroi Nirenberg

F. moniliforme var. *subglutinans* Wr. & Reink

F. moniliforme Sheldon emend. Snyd. & Hans. pro parte

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู สีขาว เจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อมีอายุมากขึ้นเส้นใยมีสีชมพู ชมพูแซมด้วยสีม่วง จนถึงสีชมพูอมม่วง ขนาดความยาวของโคโลนีในหลอดอาหารโดยเฉลี่ยวัดได้ 7.8 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน สร้าง sporodochium สีส้มบนผิวหน้าวุ้นอาหาร โคโลนีด้านใต้วุ้นอาหารมีสีม่วง หรือสีม่วงคราม พบการสร้างเม็ด sclerotium สีเขียวอมน้ำเงิน กระจายในวุ้นอาหาร

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA: เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมาก โดยสร้างเป็นกลุ่ม (false head) และสร้างต่อกันเป็นลูกโซ่ยาวบน microconidiophore แบบ monophialide microconidia รูปไข่ (oval) ถึงรูปกระบอง (club-shaped) มี 1 เซลล์ ไม่มีสี ขนาด 2-3 x 6-9 ไมครอน macroconidium สร้างบน conidiophore แบบ monophialide ที่แตกกิ่งก้านและรวมกันเป็นกลุ่ม (mass) บน sporodochium ที่มีสีส้ม และมีรูปร่างแบบ cushion-shaped macroconidium รูปร่าง fusiform โค้งเล็กน้อยจนถึงเกือบตรง ช่วงกลางสปอร์ค่อนข้างแคบยาว และผนังทั้งสองด้านขนานกัน เซลล์ที่ฐานลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) ไม่มีสี มี septum 3-6 ขนาด 20-24 x 3.5-4 ไมครอน เชื้อรานี้ไม่สร้าง chlamydospore

พืชอาศัย ข้าวโพด *(Zea mays)*

ชื่อโรค โรคลำต้นเน่าของข้าวโพดหวาน

แหล่งที่พบ อ.เมือง จ.พิษณุโลก

ลักษณะอาการ ต้นที่เป็นโรคจะมีใบเหี่ยวเฉา สีเขียวอมเทา ต่อมาแห้งตาย ลำต้นส่วนล่างใกล้ระดับผิวดิน มีแผลสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ลักษณะแผลยุบตัวลง ลำต้นแตกหรือฉีก เมื่อผ่าดูจะพบเนื้อเยื่อภายในลำต้นมีสีน้ำตาล ถึงน้ำตาลแดง อาจพบเส้นใยเชื้อราสีขาวปกคลุมอยู่ ต่อมาลำต้นกลวง ทำให้ลำต้นหักพับได้ง่าย

F. moniliforme สร้าง microconidium ได้ดี และสร้างจำนวนมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่บาง isolate สร้าง macroconidium จำนวนน้อย ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกคือ conidiophore เป็นแบบ monophialide ไม่มีการสร้าง polyphialide และมีการสร้าง microconidium ทั้งแบบเป็นกลุ่ม (false head) และแบบต่อกันเป็นลูกโซ่ (chain) ที่มีความยาวมาก บางครั้งมีจำนวน conidium ถึง 50 conidium ต่อ 1 ลูกโซ่ (Nelson *et al*., 1983) พัฒนาและคณะ (2543) ได้ศึกษาโรคถอดฝักดาบของข้าวในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2537-2538 พบว่า isolate ต่างๆ ที่แยกได้จากอาการโรคถอดฝักดาบจากหลายท้องที่ในภาคเหนือและภาคกลาง มี microconidiophore ลักษณะเป็น mono- และ polyphialide ซึ่งเป็นลักษณะของ *F. proliferatum* ในประเทศมาเลเซียมีรายงานพบราทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว (Salleh, 1988)

3. *F. oxysporum* Schlecht ex Fries, emend. Snyder & Hansen

ชื่อพ้อง : *F. oxysporum* Schlecht. Emend. Snyd. & Hans. pro parte

F. redolens Wollenw.

F. oxysporum Schlecht. Emend. Snyd. & Hans. var. *redolens* (Wollenw.) Gordon

F. oxysporum Schlecht.

F. oxysporum Schlecht. var. *redolens* (Wollenw.) Gordon

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู ละเอียด สีขาว สีขาวแซมม่วง สีชมพูม่วง สีม่วงอ่อน จนถึงสีม่วงเข้ม เจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง sporodochium สีส้มจำนวนมาก โคโลนีด้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม หรือน้ำเงินเข้ม และสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide ซึ่งเกิดจากด้านข้างของเส้นใย phialide รูปร่างคล้ายขวดหรือพินโบว์ลิ่ง ไม่มีสี มีขนาดสั้นกว่า phialide ของ *F. moniliforme* และ *F. solani* microconidia รูปไข่ ยาวรี สั้นป้อม จนถึงรูปทรงกระบอก ไม่มีสี มี 1-2 เซลล์ ส่วนใหญ่มี 1 เซลล์ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) เซลล์ที่ปลายเรียวแหลม หรือทู่มน ผนังบาง ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 24-26 x 3-4.5 ไมครอน เกิดบน conidiophore ที่แตกกิ่งก้านมากหรือเกิดบน sporodochium ที่มีลักษณะเป็นก้อน (tubercularia-like) เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือผนังขรุขระ เกิดที่บริเวณส่วนปลายเส้นใย (terminal) และส่วนกลางเส้นใย (intercalary) มักเกิดเดี่ยว แต่บางครั้งเกิดเป็นคู่หรือเป็นลูกโซ่

พืชอาศัย - กล้วย (*Musa sapientum)*

- แกลดิโอลัส *(Gladiolus hybrida*)
- ขิง (*Zingiber officinale*)
- ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis)*
- ถั่วลันเตา *(Pisum sativum*)
- ฝ้าย (*Gossypium* spp.)
- มะเขือเทศ *(Lycopersicon esculentum)*
- หน่อไม้ฝรั่ง *(Asparagus officinalis*)

ชื่อโรค - โรคตายพรายของกล้วย (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *cubense*)

พบที่ อ.สารภี จ.เชียงใหม่, อ.เมือง จ.สกลนคร, อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา, อ.เมือง จ.นครพนม, อ.เชียงคาน จ.เลย, อ.สังคม จ.หนองคาย, อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี, อ.เมือง จ.กาญจนบุรี, อ.แหลมสิงห์ จ.จันทบุรี, อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร

- โรคหัวเน่าของแกลดิโอลัส (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*)

พบที่ อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน

- โรคเหี่ยวของขิง (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi*)

พบที่ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์, อ.เมือง จ.นครพนม

- โรคเหี่ยวของถั่วฝักยาว (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*)

พบที่ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

- โรคเหี่ยวของถั่วลันเตา (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*)

พบที่ อ.พบพระ จ.ตาก

- โรคเหี่ยวของฝ้าย (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)

พบที่ อ.เชียงคาน จ.เลย

- โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)

พบที่ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา, อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย และ อ.เรณูนคร จ.นครพนม

- โรคเหี่ยวของหน่อไม้ฝรั่ง (เกิดจากเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*)

พบที่ อ.ปลวกแดง จ.ระยอง

ลักษณะอาการ ต้นพืชมีลักษณะเหลือง แคระแกรน หรือเหี่ยวเฉา คล้ายขาดน้ำ เมื่อตัดโคนต้นตามขวาง พบจุดสีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม จนถึงสีน้ำตาลดำ บริเวณท่อน้ำท่ออาหาร หรือผ่าตามยาว พบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารมีสีน้ำตาลอ่อนสลับกับน้ำตาลดำเป็นทางยาว

เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (vascular wilt) กับพืชหลายชนิด เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก ทำความเสียหายกับพืชมากที่สุด และมีความสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะกับพืช โดยลักษณะของสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ดังนั้น นักอนุกรมวิธานราที่ได้ศึกษา และจัดระบบการจำแนก จึงได้ให้ชื่อเป็น form-species เฉพาะพืชอาศัยแต่ละชนิด เช่น โรคเหี่ยวของแตงเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, โรคเหี่ยวของฝ้ายเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* และ โรคต้นเหี่ยวของถั่วเหลืองเกิดจาก *F. oxysporum* f. sp. *glycines* ซึ่งขนาดและรูปร่างของ macroconidia มีความผันแปรบ้างในระหว่าง form-species (Booth, 1971)

***4. F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg**

ชื่อพ้อง : *F. moniliforme* Sheldon pro parte

F. moniliforme Sheldon emend. Snyd. & Hans. pro parte

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เส้นใยฟู หนาแน่น ขณะยังอ่อนมีสีขาว เมื่อมีอายุมากขึ้น มีสีชมพูส้ม สีส้มชมพู จนถึงสีชมพูม่วง โคโลนีเจริญอย่างรวดเร็ว ขนาดความยาวของโคโลนีในหลอดอาหารมากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน sporodochium มีสีส้ม ถึงสีส้มเข้ม โคโลนีด้านใต้อาหารวุ้นมีสีส้มอ่อน สีม่วงแดง จนถึงสีม่วงคราม บาง isolate สร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

ลักษณะ สัณฐานวิทยา บนอาหาร CLA : ลักษณะโดยทั่วไปคล้าย *F. moniliforme* และ *F. subglutinans* ซึ่ง microconidium เกิดบน microconidiophore ทั้งแบบเป็นกลุ่ม (false head) และ ต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ (chain) แต่จำนวน conidium ในแต่ละลูกโซ่น้อยกว่า *F. moniliforme* พบสร้าง phialide ทั้งแบบ mono- และ polyphialide เช่นเดียวกับ *F. subglutinans* และไม่สร้าง chlamydospore

พืชอาศัย ข้าว *(Oryza sativa)*

เอื้องพร้าว (*Phaius* sp.)

ชื่อโรค โรคถอดฝักดาบของข้าว (bakanae disease)

โรคใบไหม้ของเอื้องพร้าว

แหล่งที่พบ - โรคถอดฝักดาบของข้าว

พบในท้องที่ จ.เชียงใหม่ แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ ร้อยเอ็ด สุรินทร์ และอุบลราชธานี

- โรคไหม้ของเอื้องพร้าว

พบที่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

ลักษณะอาการ

อาการโรคถอดฝักดาบ : อาการในระยะกล้า จะทำให้ต้นกล้าแห้งตายหลังจากปลูกไม่เกิน 7 วัน ข้าวเป็นโรคจะมีลำต้นผอมสูงเด่นกว่าต้นข้าวโดยทั่วไป ใบและยอดสีเขียวอ่อน ถึงเขียวอมเหลือง ต้นย่างปล้อง

และมีรากเกิดขึ้นที่ข้อต่อของลำต้นส่วนที่ย่างปล้อง บางครั้งรากเน่าช้ำ และข้อต่อเน่าดำ บางครั้งพบกลุ่มเส้นใยสีชมพูตรงบริเวณข้อที่ย่างปล้องขึ้นมา

อาการโรคใบไหม้ของเอื้องพร้าว : เริ่มแรกเป็นจุดสีน้ำตาล ขนาดเล็กกระจายทั่วใบ ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น ลักษณะกลม สีน้ำตาลเข้มจนถึงน้ำตาลดำ ขอบแผลสีเหลือง ตรงกลางมีวงซ้อนกันเป็นชั้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 เซนติเมตร หากเกิดที่ขอบแผลจะทำให้ขอบใบไหม้ พบอาการที่ก้านใบด้วย เป็นขีดสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลืองเห็นได้ชัด

Nelson, *et al*. (1983) จัด *Fusarium* ใน section Liseola จำนวน 4 ชนิด คือ *F. moniliforme, F. proliferatum, F. subglutinans* และ *F. anthophilum* มีลักษณะโดยทั่วไปใกล้เคียงกันมาก จะแตกต่างกันในบางลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาเพื่อจำแนกชนิด ต้องใช้ความละเอียดถี่ถ้วน และดำเนินการตามขั้นตอนของ Nelson, *et al*. (1983) (หากใช้ระบบการจัดจำแนกของ Nelson) และควรศึกษาจำนวนหลายๆ isolate เพื่อเปรียบเทียบกัน ในต่างประเทศมีรายงานพบเชื้อรานี้บนพืชตระกูลกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* (http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/f-prolif.htm.) ซึ่งในประเทศไทยได้พบบนเอื้องพร้าวเพียงชนิดเดียว ปลูกในโรงเรือนที่ให้ความชื้นตลอดเวลา ในสวนพฤษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าฯ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่

5. *F. semitectum* Berk. & Rav.

ชื่อพ้อง : *F. roseum* Lk. emend. Snyd. & Hans. pro parte

F. roseum Lk. emend. Snyd. & Hans. var. *arthrosporioides* (Sherb.) Messiaen & Cassini pro parte

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เส้นใยฟูหนา ขณะยังอ่อนมีสีขาวนวล เมื่ออายุมากขึ้นมีสีน้ำตาลอ่อน จนถึงสีน้ำตาลเหลือง เจริญอย่างรวดเร็ว ขนาดความยาวของโคโลนีบนหลอดอาหารมากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน สร้าง sporodochium สีส้มอ่อนบนผิวหน้าอาหาร โคโลนีด้านใต้อาหารวุ้น มีสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : ไม่ค่อยพบสร้าง microconidium ส่วน macroconidium มี 2 ลักษณะ ลักษณะแรกรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle-shaped) ตรงหรือโค้งเล็กน้อย เซลล์ที่ฐานมี papilla เป็นตุ่มเล็กๆ ไม่มีรูปร่างคล้ายเท้า (foot-shaped) ส่วนปลายเรียวแหลม ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 17-28 x 2.5-4 ไมครอน เกิดบน conidiophore แบบ mono- และ polyphialide ที่แตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน และชูลอยในอากาศอยู่กับกลุ่มเส้นใย ลักษณะที่สอง รูปร่าง fusoid-shaped โค้ง เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) ปลายเรียวแหลมถึงทู่มน ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 17-28 x 2.5-4 ไมครอน ลักษณะคล้าย *F. oxysporum* มาก เกิดบน conidiophore แบบ mono- และ polyphialide ที่แตกกิ่งก้านมาก และอยู่เป็น mass ที่เรียกว่า sporodochium เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore รูปกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 ไมครอน เกิดเดี่ยวหรือต่อเป็นลูกโซ่ ที่ส่วนกลางเส้นใย

พืชอาศัย ข้าว (*Oryza sativa*)

ชื่อโรค โรคเมล็ดด่าง (dirty panicle disease)

แหล่งที่พบ พบทั่วไปในแหล่งปลูกข้าวในภาคกลาง

ลักษณะอาการ เมล็ดบางส่วนบนรวงข้าว มีจุดหรือขีดสีน้ำตาลดำ หรือสีเทาอมชมพู ทั้งนี้เพราะเชื้อราสาเหตุโรคที่เจริญอยู่มีหลายชนิดและมีหลายสี จึงทำให้เกิดอาการและสีต่างๆ กัน การเข้าทำลายมักเกิดในช่วงดอกข้าวเริ่มโผล่จากกาบหุ้มรวง จนถึงระยะเมล็ดข้าวเริ่มเป็นน้ำนม อาการเมล็ดด่างจะปรากฏเด่นชัดในระยะใกล้เก็บเกี่ยว

โดยปกติ เชื้อราชนิดนี้เป็นพวก saprophyte หรือ secondary invader กับพืช มักพบเสมอบนเมล็ดพืชหลังการเก็บเกี่ยว ทำความเสียหายกับเมล็ด ทำให้เมล็ดมีคุณภาพต่ำ สูญเสียความงอก และเชื้อรายังสามารถติดไปกับเมล็ดได้ (seed-borne) (Neergaard, 1977)

6. *F. solani* (Mart.) Appel & Wollenw. Emend. Snyd. & Hans **ชื่อพ้อง :** *F. javanicum* Koorders

F. coeruleum (Libert) Sacc.

F. solani (Mart.) Sacc.

F. eumartii Capenter

F. illudens Booth

F. ventricosum Appel. & Wollenw.

F. solani (Mart.) Sacc. var. *coeruleum* (Sacc.) Booth

F. tumidum Sherb.

F. solani (Mart.) Sacc. var. *coeruleum* (Sacc.) Bilai

F. solani (Mart.) Sacc. var. *ventricosum* (Appel & Wollenw.) Joffe

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เส้นใยฟู ขณะยังอ่อนมีสีขาวนวล เมื่ออายุมากขึ้นมีสีครีม หรือสีครีมแซมด้วยสีน้ำเงิน เจริญอย่างรวดเร็ว ขนาดความยาวของโคโลนีในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ 7 เซนติเมตร เมื่ออายุได้ 12 วัน sporodochium บนผิวอาหารมีลักษณะเป็นเลื่อมมัน สีครีม บางครั้งเส้นใยยุบตัวลง เห็นแต่เฉพาะ sporochium จำนวนมาก บาง isolate มีสีน้ำเงินแกมเขียว โคโลนีด้านใต้วุ้นอาหารมีสีครีม สีน้ำเงินแกมเขียว หรือสีคราม อาจสร้างหรือไม่สร้างเม็ด sclerotium

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : microconidium เกิดเป็นกลุ่มแบบเป็นกลุ่ม (false head) บน conidiophore แบบ monophialide ซึ่งอาจแตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน microconidium รูปไข่ รูปไต มี 1-2 เซลล์ ไม่มีสี ขนาด 8-16 x 2-4 ไมครอน macroconidia ไม่มีสี รูปทรงกระบอก ลักษณะอ้วน (stout) บริเวณกลาง conidium ค่อนข้างตรง และผนัง 2 ด้านขนานกันจนเกือบตลอด โค้งเข้าเล็กน้อยตรงส่วนหัวและส่วนท้าย เซลล์ปลายสุดโค้งมน เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายท้า (foot-shaped) ขนาดสั้น หรือเป็น notch มี

septum 3-5 ขนาด 35-55 x 4.5-6 ไมครอน macroconidiophore อาจแตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้านเป็นแบบ monophialide เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore สีน้ำตาล รูปไข่หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือขรุขระ เกิดเดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ ที่บริเวณส่วนปลายหรือส่วนกลางเส้นใย chlamydospore มีขนาด 10-17 x 9-12 ไมครอน

พืชอาศัย มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum)*

ถั่วเหลือง *(Glycine max)*

ชื่อโรค โรคเน่าดำ (black rot) ของมันฝรั่ง

โรคเร่งตายของถั่วเหลือง (sudden death syndrome)

แหล่งที่พบ - โรค black rot ของมันฝรั่ง

พบที่ อ.เซกา จ.หนองคาย

- โรคเร่งตายของถั่วเหลือง

พบที่ จ.ลพบุรี และ จ.นครสวรรค์

ลักษณะอาการ

อาการโรคเน่าดำ (black rot) ของมันฝรั่ง : อาการเริ่มแรก บริเวณผิวจะยุบตัวลง และมีสีน้ำตาล ขนาด 1x1 เซนติเมตร พบกระจายอยู่ทั่วหัว ถ้าแผลแก่มากจะมีสีน้ำตาลเข้ม แผลยุบตัวบุ๋มลงในเนื้อหัว บางแผลอาจพบเส้นใยสีขาวของเชื้อราด้วย เมื่อผ่าดูพบเนื้อมันเป็นสีน้ำตาล

อาการของโรคเร่งตายของถั่วเหลือง : บนใบมีจุดสีเหลืองขนาด 2-3 เซนติเมตร กระจายทั่วใบ ใบร่วงจากส่วนล่างจนถึงกลางลำต้น ต้นเหี่ยวและทรุดโทรมในที่สุด หากโรคเข้าทำลายในระยะออกดอก และติดฝัก ดอกและฝักจะลีบ ไม่พัฒนาเป็นฝักแก่ เมื่อผ่าลำต้นบริเวณส่วนโคนและราก พบว่าเนื้อเยื่อภายในมีสีน้ำตาลแดง ส่วนรากแขนงแห้งตาย ปริมาณรากมีน้อย

False head ของกลุ่ม microconidium มีขนาดค่อนข้างใหญ่ เมื่อเทียบกับ false head ของ *F. oxysporum* และ *F. moniliforme* ส่วน monophialide ที่สร้าง microconidium มีความยาวเป็น 2 และ 3 เท่า ของ monophialide ของ *F. moniliforme* และ *F. oxysporum* ตามลำดับ

โรคเร่งตายของถั่วเหลืองในประเทศไทย นลินีและคณะ (2545) ได้ศึกษาตัวอย่างถั่วเหลืองที่เป็นโรคนี้จำนวนมากจากหลายแหล่งปลูกของประเทศ และรายงานว่าทุก isolate ที่ทำการศึกษามีลักษณะและขนาดใกล้เคียงกับ *F. solani* form B (FSB) ซึ่งเปรียบเทียบกับรายงานจากต่างประเทศที่จำแนก strain ของ *F. solani* สาเหตุโรคเร่งตายของถั่วเหลืองเป็น 2 strains คือ *F. solani* form A (FSA) และ *F. solani* form B (FSB)

7. *F. subglutinans* (Wollen. & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas

ชื่อพ้อง : *F. sacchari* (Butler) Gams var. *subglutinans* (Wollenw. & Reinking) Nirenberg

F. moniliforme Sheldon emend. Snyd. & Hans. 'Subglutinans' sensu Snyd., Hans. & Oswald

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อรามีเส้นใยฟู สีขาว หรือแซมด้วยสีม่วง เจริญอย่างรวดเร็ว ขนาดความยาวในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน sporodochium มีสีน้ำตาลอ่อน ถึงสีส้ม โคโลนีด้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วง สีม่วงน้ำเงิน จนถึงสีม่วงเข้ม เมื่ออายุมากขึ้น สร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงินเข้มกระจายทั่วไป

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium และ macroconidium ที่มีรูปร่างคล้าย *F. moniliforme* ต่างกันตรงที่ microconidia เกิดเป็นกลุ่มแบบ false head เท่านั้น ไม่พบมีการสร้างแบบต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ ส่วน microconidiophore เป็นแบบ mono- และ polyphialide เช่นเดียวกับ *F. proliferatum* และไม่สร้าง chlamydospore ขนาดของ microconidium ประมาณ 8-12 x 2.5-3 ไมครอน และขนาด macroconidium ประมาณ 32-53 x 3-4.5 ไมครอน

พืชอาศัย อ้อย (*Saccharum officinarum)*

ชื่อโรค โรคเหี่ยวของอ้อย (wilt disease of sugarcane)

แหล่งที่พบ จ.ระยอง และ จ.สระแก้ว

ลักษณะอาการ อ้อยมีอาการใบเหลือง ปลายใบแห้ง ระบบรากถูกทำลาย เน่าเสียหาย เมื่อผ่าบริเวณโคนต้นตามยาว จะพบอาการเน่าช้ำสีแดง อาการลุกลามทั้งลำ ทำให้ลำแห้งตายในที่สุด ส่วนยอดเหี่ยว บางครั้งอาจไม่พบอาการภายในลำต้น แต่พบเฉพาะอาการเน่าที่ราก อาการนี้ทำให้ใบเหลืองเท่านั้น ส่วนยอดไม่เหี่ยว

โรคเหี่ยวของอ้อย เกิดจาก *F. subglutinans* มีรายงานพบเชื้อรา *Cephalosporium* sp. ร่วมอยู่ด้วย ส่วนโรคยอดบิด (Pokkah boeng) เกิดจาก *F. subglutinans* ร่วมกับ *F. moniliforme* (นิรนาม, 2545)

การเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium*

การเก็บรักษาเชื้อ รา *F.graminearum*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F.semitectum*, *F. solani* และ *F. subglutinans* บริสุทธิ์ โดยวิธีเก็บแบบแห้งแข็งสูญญากาศ (Lyophilization) วิธีเก็บแห้งบนกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. วิธีเก็บแห้งในดินสวน ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. และวิธีเก็บในกลีเซอรีน 10% ที่อุณหภูมิ – 80°ซ. สามารถทำให้เชื้อรามีชีวิตรอดได้ไม่ต่ำกว่า 2 ปี 6 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโคโลนีและสปอร์ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเก็บทั้ง 4 วิธี พบว่าวิธีการเก็บแบบแห้งแข็งสูญญากาศเป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีที่ สุด ส่วนวิธีการเก็บในกลีเซอรีน 10% ที่อุณหภูมิ – 80°ซ. เป็น

วิธีการเก็บรักษาที่ดีรองลงมา และดีกว่าวิธีการเก็บแบบแห้งบนกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. และวิธีเก็บแห้งในดินสวน ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ.

สรุปผลการทดลอง

จากการรวบรวมและจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Fusarium* สาเหตุโรคชนิดต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจ ในประเทศไทย จำนวน 88 ไอโซเลท ระหว่างเดือนตุลาคม 2543 – กันยายน 2546 สามารถจำแนกรา *Fusarium* ที่พบได้ 7 ชนิด (species) 8 formae speciales (f. sp.) ได้แก่ *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. proliferum*, *F. semitectum*, *F. solani*, *F. subglutinans* และ *F. oxysporum* จำนวน 8 formae speciales ได้แก่ *F. oxysporum f.* sp. *asparagi*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*, *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici, F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* และ *F. oxysporum* f. sp. *zingiberi* การเก็บรักษาเชื้อราสกุล *Fusarium* พบว่า ในระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน วิธีการเก็บแบบแห้งแข็งสูญญากาศ (Lyophiliztion) เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีที่ สุด ส่วนวิธีการเก็บในกลีเซอรีน 10% ที่อุณหภูมิ – 80°ซ. เป็นวิธีการเก็บรักษาที่ดีรองลงมา ซึ่งดีกว่าวิธีการเก็บแบบแห้งบนกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ. และเก็บแห้ง ในดินสวน ที่อุณหภูมิ 8-10 °ซ.

เอกสารอ้างอิง

นลินี ศิวากรณ์, ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา, สุธามาศ ณ น่าน และวุฒิศักดิ์ บุตรธนู. 2545. เชื้อรา *Fusarium solani* สาเหตุโรคเร่งตายของถั่วเหลือง. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 12 (1): 43-53.

นิรนาม. 2543. โรคข้าวและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 49 หน้า.

นิรนาม. 2545. คู่มือโรคพืชไร่. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 105 หน้า.

พัฒนา สนธิรัตน, พากเพียร อรัญนารถ และศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์. 2543. ลักษณะของ *Fusarium proliferatum* (Mutsushima) Nirenberg สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว, หน้า 55. *ใน* การประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี 2543, 8-10 มีนาคม 2543, อ.ชะอำ จ. เพชรบุรี. (บทคัดย่อและสรุปผลการดำเนินงาน)

พัฒนา สนธิรัตน, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน, ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์, วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 285 หน้า.

Ainsworth, G. C. 1973. Introduction and keys to higher taxa, pp.1-7. *In* The fungi Vol.IV B. Eds., G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow, and A.S. Sussman. Academic Press, New York.

Barron, G.L. 1977. The Genera of Hyphomycetes from Soil. 3rd ed. Noble offset printers, Inc., New York. 364 p.

Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. C.M.I., Kew, Surrey, England. 237 p.

Brayford, L. R. 1985. The genus Fusarium. C.M.I. International course on the identification of fungi and bacteria of agriculture importance. 4 p.

Domsch, K.H., W. Gams, and T.H. Anderson. 1980. Compendium of Soil Fungi. Academic Press, London. 859 p.

Http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/f-prolif.htm.

Neergaard, P. 1977. Seed Pathology, Vol.1. The Macmillan Press Ltd., London & Basingstoke. 839 p.

Nelson, P. E., T. A. Toussoun, and W. H. O. Marasas. 1983. Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 193 p.

Ou, S. H. 1984. Rice Diseases. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 270 p.

Salleh, B. 1988. Distribution, Biology and Control of 'Bakanae' Disease in the Malaysian Peninsula. The Sixth International Fusarium Workshop. (Abstr. of Papers.)

Ventura, J. A. 1988. Present status of Panama disease (Fusarium wilt) in Espirita Santo State Brazil. The Sixth International Fusarium Workshop, August 30-31, 1988., Tsukuba Science City, Japan. 40 p. (Abstr. of Papers)

Zillinsky, F. J. 1983. Common Disease of Small Grain Cereals, A Guide to Identification. CIMMY T, Mexico. 141 p.

รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

Collection and Taxonomy of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Thailand and preservation under Sterile Distilled Water and Oil

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช

วงศ์ บุญสืบสกุล สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้ม โดยทำการเก็บรวบรวมเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ที่แยกจากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆจากแหล่งต่างๆทั่วประเทศจำนวน 152 ไอโซเลท นำมาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า เป็น Gram negative ไม่สร้าง spore มีหาง (Flegellation)หางเดียว มีการใช้ oxygen (Oxydation) สามารถย่อยแป้ง (Starch) ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย Casein สร้างเอนไซม์ Lecithinase ได้ ไม่ใช้ Arginine และ Gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอ็นไซม์ Ureasa เกิดก๊าซ Hydrogen sulphide (H_2S) สร้างสาร Acetoin เกิด proteolysis ใน Litmus milk (peptonization) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36^0C สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3% , 5% ถึง 7% ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอ็นไซม์ tyroinase

จากการศึกษาการใช้น้ำตาล 31 ชนิด ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* ทั้ง 152 ไอโซเลท พบว่า มีความแตกต่างกันในการใช้น้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ Rhamnose Sorbitol และ Salicin โดยสามารถแบ่งกลุ่มตามการใช้น้ำตาลทั้ง 3ชนิดได้ 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin มี 23 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin มี 44 ไอโซเลท กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่ทั้งสองน้ำตาล มี 25 ไอโซเลท กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ทั้งสองน้ำตาล มี 60 ไอโซเลท

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* โดยการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ชนิดต่างๆ 4 ชนิดได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน มะกรูด และส้มโอสามารถแบ่งความรุนแรงของเชื้อ

รหัสทะเบียนวิจัย 44 11 002 003 44 11 002 005

(pathogenic strain) เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้มทั้ง 4 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน มี 111 ไอโซเลท กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด และส้มโอ แต่ไม่เป็นโรคกับส้มเขียวหวาน มี 22 ไอโซเลท กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว มะกรูด แต่ไม่เป็นโรคกับส้มโอ ส้มเขียวหวาน มี 6 ไอโซเลท กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน แต่ไม่เป็นโรคกับมะกรูด มี 13 ไอโซเลท กลุ่มที่ระบาดมากและรุนแรงที่สุดคือกลุ่มที่ 1 สามารถเข้าทำลายพืชทดสอบได้ทั้ง 4 ชนิด การเก็บรักษาเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ภายใต้น้ำมันพาราฟิน และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 ปี ทุกไอโซเลทยังมีชีวิตและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนเดิมทุกประการ สามารถเกิดโรคบนพืชอาศัยได้เหมือนเดิมเช่นกัน

คำนำ

โรคแคงเกอร์เป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของพืชตระกูลส้มที่พบแพร่ระบาดทำความเสียหายอย่างรุนแรงในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกส้มทั่วโลก (Fawcett , 1936) ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบโรคแคงเกอร์ระบาดทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมส้มเป็นจำนวนมาก รัฐบาลกลางต้องออกกฎหมายควบคุมการระบาดและใช้เงินเป็นจำนวนมากในการป้องกันกำจัด (Schoulties *et al*, 1987) จนถึงปัจจุบันยังมีรายงานการระบาดของโรคนี้ในสหรัฐอเมริกา โรคนี้สามารถเข้าทำลายต้นส้มได้ในทุกส่วนของต้น และมักพบระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน (อำไพวรรณ และคณะ ,2527) เมื่อเป็นโรคมากๆจะทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ใบร่วงต้นแคระแกรน ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ (อำไพวรรณ และคณะ ,2527) สาเหตุของโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* (Dye *et al*.,1980, วิวัฒน์, 2510) โรคนี้มีความสำคัญทางกักกันพืช (Schoulties *et al*, 1987) จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถแบ่งกลุ่มตามการแพร่ระบาดในแหล่งต่างๆทั่วโลก(geographic distribution) และตามพืชอาศัย(Host rage) (Schoulties *et al*, 1987) เป็น 3 กลุ่ม canker A เป็นกลุ่มที่แพร่ระบาดมากที่สุดในเอเชีย แอฟริกา หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก และในอเมริกาใต้ เชื้อในกลุ่มนี้จัดเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างที่สุด canker B เป็นกลุ่มที่เกิดกับพวกมะนาวหวาน (Lemon) ในอาร์เจนตินา อุรุกวัย และปารากวัย canker C เป็นกลุ่มที่เกิดโรคกับมะนาวแม็กซิโก (Mexican Lime) ในประเทศไทยพบระบาดเข้าทำลายพืชตระกูลส้มทุกชนิดในแหล่งปลูกทั่วประเทศ ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการรวบรวมสายพันธุ์และอนุกรมวิธานเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* เชื้อสาเหตุโรคแคงเกอร์ที่พบในประเทศไทย เป็นการศึกษาความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทที่พบในประเทศไทยและวิธีการเก็บรักษาเชื้อให้มีชีวิตยืนนานโดยที่คุณสมบัติต่างๆและการทำให้เกิดโรคไม่เปลี่ยนแปลง

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเกอร์ ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มจากพืชตระกูลส้มชนิดต่าง ๆ ที่เก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยนำตัวอย่างโรคแคงเกอร์ที่เก็บมาตัดตรงบริเวณแผลที่เป็นใหม่ ๆ เป็นรูปสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง จากนั้นนำไปแช่ 70% แอลกอออล์ เป็นเวลา 5 นาที ล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง จากนั้นนำไปบดในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้วบดให้ละเอียด นำ suspension มา streak ลงบนอาหาร Potato sucrose agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28^0 ซ นาน 3-4 วัน คัดเลือกโคโลนีสีเหลือง มัน นูน ขอบเรียบบนอาหาร PSA นำไปทำให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อไว้ภายใต้น้ำมัน(paraffin oil) และ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี นำเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ที่รวบรวมได้ทั้ง 152 เชื้อ นำมาเลี้ยงในอาหาร PSA ให้มีอายุ 36-48 ชั่วโมง นำมาทำการจำแนกชนิดของแกรม (Gram reaction) โดยใช้ด่าง 3 % ตามวิธี KOH Solubility test จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี เช่น Oxidation-Fermentative test (Hugh *et al*., 1953) Hydrolysis of Arginine (Thornly, 1960), locithinase (Mc Clung *et al*, 1947) บางปฏิกิริยาใช้วิธีการตาม Schaad (1988) ได้แก่ liquefaction of gelatin, Hydrolysis of aesculin, Production of urease, Production of hydrogen sulphide, tyrosinase, Reduction of nitrate, Litmus milk, Production of Acetoin, NaCl 3% 5% และ 7% การเจริญเติบโตที่ 36^0 ซ นอกจากนี้ยังมี Hydrolysis of Starch, Hydrolysis of Tween 80 (Lelliott and Stead, 1987), Hydrolysis of casein (Smibert and Krieg, 1981),Gluconate test (Lelliott and Stead, 1987) บันทึกผลการทดลองเหล่านั้นเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* จากต่างประเทศ คือ ประเทศญี่ปุ่นและอาร์เจนตินา (Goto *et al*, 1980)

แบ่งกลุ่มของเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ตามการใช้น้ำตาล นำเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* มาเลี้ยงในอาหาร PSA ให้มีอายุ 36-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทดสอบการใช้น้ำตาล (Utilization of Carbohydrates) โดยใช้ตามวิธีของ Schaad (1988) การเตรียมน้ำตาลโดยการกรองด้วย Millipore filter ขนาด 45 um โดยให้มีความเข้มข้นของน้ำตาล 10% ทำการทดลองโดยเช็คผล 7, 14, และ21 วัน ตามลำดับ ซึ่งในอาหารจะมีสี Bromthymol Blue เป็น Indicator โดยดูการเปลี่นสีของอาหาร ถ้ามีการใช้น้ำตาล อาหารจะเปลี่ยนสีไปจากเดิม โดยถ้ามีการใช้น้ำตาลและสร้างกรด (Acid production) จะเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง -ส้ม เกิดการสร้างด่าง (alkali production) จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินเข้ม นำผลการที่ได้นำมาจัดกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ตามการใช้น้ำตาล

การทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* โดยการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยนำเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* มาเลี้ยงในอาหาร PSA ให้มีอายุ 36-48 ชั่วโมง ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.1 ที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ใช้ใบพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ 4 ชนิดได้แก่ มะนาว ส้มเขียวหวาน มะกรูด และส้มโอ เป็นพืชทดสอบ นำใบพืชทดสอบมาล้างผิวใบ

ด้วย Na OCl 1 % นาน 1-2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งแล้ว 2-3 ครั้ง วางใบที่ล้างผิวแล้ว ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่เทด้วย water agar 1 % โดยคว่ำใบให้ด้านหลังใบอยู่ด้านบน ปลูกเชื้อ แบคทีเรียที่เตรียม โดยใช้เข็มทำให้เกิดแผล (pricking method) โดยทำแผลที่ผิวใบส่วนระหว่างเส้นใบ (vein) โดยใช้เข็มสกิดผิวให้เกิดแผล แล้วหยด bacterial suspension บนแผล หลังจากปลูกเชื้อบนใบแล้วปิดจานเลี้ยงเชื้อด้วยเทปใสเพื่อกันความชื้นออกนอกจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28^0 ซ.ที่มีแสงสว่างในตู้เก็บไว้เป็นเวลา 7-14 วัน แล้วจึงตรวจผลการทดลอง การตรวจผลนับจำนวนแผลบนใบส้มแต่ละชนิด แต่ละเชื้อแผลที่แสดงอาการโรคจะเป็นขุยสีขาวฟูขึ้นมาจากผิวใบตรงส่วนที่ปลูกเชื้อไว้

การเก็บรักษาเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

ภายใต้น้ำมันพาราฟิน นำเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง เลี้ยงบนอาหารเอียง (PSA slant) ในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวให้มีอายุ 48 ชั่วโมง จำนวน 24 หลอดต่อไอโซเลท เททับด้วยน้ำมันพาราฟินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยเทให้สูงกว่าอาหาร 1 นิ้ว เก็บไว้ incubator ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ตรวจเช็คความอยู่รอดโดยใช้เชื้อที่เก็บรักษา 1 หลอดต่อการตรวจเช็ค ทำการตรวจเช็คทุกๆ 3 เดือน โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ตรวจเช็คการมีชีวิต คุณสมบัติทางชีวเคมีและการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เตรียมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 7 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว จำนวน 24 หลอดต่อไอโซเลท นำเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) แตะเชื้อจำนวน1ลูปเต็มใส่ในหลอดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้ 1 ลูปต่อหลอดทดลอง เก็บไว้ incubator ที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส ตรวจเช็คความอยู่รอดโดยใช้เชื้อที่เก็บรักษา 1 หลอดต่อการตรวจเช็ค ทำการตรวจเช็คทุกๆ 3 เดือนโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ตรวจเช็คการมีชีวิต คุณสมบัติทางชีวเคมีและการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัย

ผลการทดลองและวิจารณ์

เชื้อบักเตรีสาเหตุโรคแคงเกอร์ ทำการแยกเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มชนิดต่าง ๆ ซึ่งเก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยทั้งหมด 152 เชื้อ โดยรายละเอียดเกี่ยวกับพืชที่เกิดโรคและสถานที่ (ตารางที่ 1)

คุณสมบัติทางชีวเคมี จากผลการทดลองศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ทั้ง 152 เชื้อ (ตารางที่ 2) พบว่าเชื้อทั้ง 152 ไอโซเลท เป็น Gram negative ไม่สร้าง spore มีหาง (Flegellation)หางเดียว มีการใช้ oxygen (Oxydation) สามารถย่อยแป้ง (Starch) ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย Casein สร้างเอนไซม์ Lecithinase ได้ ไม่ใช้ Arginine และ Gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอ็นไซม์ Ureasa เกิดก๊าซ Hydrogen sulphide (H2S) สร้างสาร Acetoin เกิด proteolysis ใน Litmus milk (peptonization) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36^0C สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3% , 5% ถึง 7% ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอ็นไซม์ tyroinase

การแบ่งกลุ่มเชื้อ X. campestris pv.citri โดยการใช้น้ำตาล จากการทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ *X. campestris* pv.*citri*_(Utilization of Carbohydrates) ตรวจผลที่ 21 วัน (ตารางที่ 3) พบว่าเชื้อทั้ง 152 เชื้อ สามารถใช้น้ำตาลพวก arabinose , xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, treehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, starch, malonate, citrate, succinate และ malate แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลพวก L- methyl, D-glocoside, raffinose, inositol, inulin, dulcitol, gluconate, oxalate, acetate และ tartrate และพบว่าเกิดความแตกต่างใน 3 น้ำตาล คือ rhamnose, sorbitol และsalicin สามารถแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ออกเป็น 4 กลุ่มด้วยกัน (ตารางที่ 1และ 4) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin มี 23 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin มี 44 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือไม่ทั้งสองน้ำตาล มี 25 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ทั้งสองน้ำตาล มี 60 ไอโซเลท

จากการนำเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ที่แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่าง ๆ ตามทั้ง 152 ไอโซเลท นำไปศึกษาปฏิกิริยาชีวเคมี พบวาเชื้อทั้ง 152 ไอโซเลท สามารถย่อยแป้ง (Starch), ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย casein ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite สร้างก๊าซไข่เน่า (Hydrogen sulfide) , สามารถใช้ aesculin , สร้าง Acetion ไม่สามารถใช้ Arginine และ gluconate ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease สามารถสร้างเอนไซม์ lecithinase พบในบางเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ tryosinase เป็นส่วนใหญ่ ส่วนน้อยไม่สามารถสร้างเอนไซม์ tryosinase เกิด proteolysis ใน Litmus milk สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 36^0 C ทนทานต่อเกลือ NaCl ถึง 7 %

จากการศึกษาการใช้น้ำตาลของเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ทั้ง 152 ไอโซเลท พบว่า สามารถใช้น้ำตาล arabinose, xylose, glucose, fructose, galactose, mannose, maltose, lactose, trehalose, sucrose, glycerol, mannitol, glycogen, dextrin, starch, malonate, citrate, succinate และ malate แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลพวก L- methyl, D-glycoside, raffinose, inositol, inulin, dulcitol, gluconate, oxalate, acetate และ tartrate และพบว่าเกิดความแตกต่างใน 3 น้ำตาล คือ rhamnose, sorbitol และ salicin แตกต่างกันระหว่างเชื้อ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มตามการใช้น้ำตาล 4 กลุ่ม โดยพบว่ากลุ่มที่ 4 พบมากที่สุดถึง 40 % รองลงมาคือ กลุ่มที่ 2 มี 29 % กลุ่มที่มีน้อยที่สุดได้แก่ กลุ่มที่ 1 มี 15 % จากการใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นของ rhamnose, sorbitol และ salicin ส่วนใหญ่พบว่า ปฏิกิริยาเหล่านั้นจะเกิดการสร้างด่าง (alkali production) โดยพบอาหารน้ำตาลที่ใช้เปลี่ยนจากสีเดิมจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงินเข้ม ในปฏิกิริยาในน้ำตาลชนิดอื่น ๆ พบว่ามีการสร้างกรด (acid production) โดยอาหารน้ำตาล สีเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง -ส้ม ซึ่งทั้งการสร้างกรดและด่างที่เกิดขึ้น ก็เกิดเนื่องมาจากมีการใช้น้ำตาลนั้นเอง

ผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* พืชตระกูลส้ม 4 ชนิด ปรากฏว่าสามารถแบ่งความรุนแรงของเชื้อ (pathogenic strain) เป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 1และ 5) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้มทั้ง 4 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้มเขียวหวาน มี 111 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด และส้มโอ แต่ไม่เป็นโรคกับส้มเขียวหวาน มี 22 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว มะกรูด แต่ไม่เป็นโรคกับส้มโอ ส้มเขียวหวาน มี 6 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน แต่ไม่เป็นโรคกับมะกรูด มี 13 ไอโซเลท

ในการทดสอบความรุนแรงบนพืชทดสอบพืช 4 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ส้มโอ แล ะส้มเขียวหวาน พบว่า ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และมะกรูด จะมีความต้านทานต่อ เชื้อบาง ไอโซเลท ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 1และ 5 ในการแบ่งกลุ่ม (strain) ของเชื้อทั้งหมด 152 เชื้อ พบว่ากลุ่ม 1 เป็นกลุ่มที่เกิดโรคกับส้มทั้ง 4 ชนิด ที่ทดสอบมีจำนวนถึง 111 ไอโซเลท คิดเป็นเปอร์เซ็นได้ 73.33% ซึ่งเป็นกลุ่มที่ระบาดมากที่สุดในประเทศไทยและสามารถเกิดขึ้นกับพืชตระกูลส้มทุกชนิดหลาย ๆ แหล่งในประเทศไทย จากรายงานของ Brunings and Gabriel (2003) ได้รายงานการเกิดโรคของเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ กลุ่มสายพันธุ์ต่างๆกับพืชตระกูลส้ม 4 ชนิด ได้แก่ ส้มเขียวหวาน (Sweet orange), Grapefruit, มะนาวหวาน (Lemon) และ มะนาว (Mexican lime) โดยพบว่า กลุ่มสายพันธุ์ canker A สามารถเกิดโรครุนแรงกับพืชตระกูลส้มทั้งสี่ชนิด ส่วน canker B เกิดโรครุนแรงเฉพาะใน มะนาว (Mexican lime) และสามารถเกิดโรคเล็กน้อยใน ส้มเขียวหวาน (Sweet orange), Grapefruit, มะนาวหวาน (Lemon) ในขณะที่ canker C เกิดโรครุนแรงเฉพาะใน มะนาว (Mexican lime) และไม่เกิดกับ ส้มเขียวหวาน (Sweet orange), Grapefruit และ มะนาวหวาน (Lemon) เชื้อ *X. campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่พบในประเทศไทยส่วนใหญ่สามารถเกิดโรครุนแรงกับส้มเขียวหวาน และ มะนาว เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Brunings and Gabriel (2003) แล้ว เชื้อ *X. campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ ที่พบในประเทศไทยน่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม canker A

การเก็บรักษาเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* ภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

ผลการเก็บรักษาเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อทำการตรวจเช็คทุกๆ 3 เดือนโดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PSA ตรวจเช็คการมีชีวิต คุณสมบัติทางชีวเคมีและการทำให้เกิดโรคบนพืชอาศัยพบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 ปี ทุกไอโซเลทยังมีชีวิตและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนเดิมทุกประการ สามารถเกิดโรคบนพืชอาศัยได้เหมือนเดิมเช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

1. แยกเชื้อ *X. campestris* pv.*citri* สาเหตุโรคแคงเกอร์ของพืชตระกูลส้มชนิดต่าง ๆ ซึ่งเก็บ รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้ทั้งหมด 152 ไอโซเลท

2. เชื้อทั้ง 152 ไอโซเลททดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า เป็น Gram negative ไม่สร้าง spore มีหาง (Flegellation)หางเดียว มีการใช้ oxygen (Oxydation) สามารถย่อยแป้ง (Starch) ย่อย gelatin, ย่อย Tween 80 และย่อย Casein สร้างเอนไซม์ Lecithinase ได้ ไม่ใช้ Arginine และ Gluconate ไม่สามารถเปลี่ยน nitrate เป็น nitrite ได้ ไม่สร้างเอ็นไซม์ Ureasa เกิดก๊าซ Hydrogen sulphide (H2S) สร้างสาร Acetoin เกิด proteolysis ใน Litmus milk (peptonization) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 36^{0}C สามารถทนทานต่อเกลือ NaCl ได้ตั้งแต่ 3% , 5% ถึง 7% ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอ็นไซม์ tyroinase

3. สามารถแบ่งกลุ่มตามปฏิกิริยาการใช้น้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin มี 23 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล rhamnose, sorbitol และsalicin มี 44 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือไม่ทั้งสองน้ำตาล มี 25 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถใช้น้ำตาล salicin แต่ใช้น้ำตาล sorbitol หรือ rhamnose อย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ทั้งสองน้ำตาล มี 60 ไอโซเลท

4. สามารถแบ่งความรุนแรงของเชื้อ (pathogenic strain) เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้มทั้ง 4 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ส้มโอ และส้ม เขียวหวาน มี 111 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับพืชตระกูลส้ม 3 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด และส้มโอ แต่ไม่เป็นโรคกับส้มเขียวหวาน มี 22 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว มะกรูด แต่ไม่เป็นโรคกับส้มโอ ส้มเขียวหวาน มี 6 ไอโซเลท

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่เป็นโรคกับมะนาว ส้มโอ และส้มเขียวหวาน แต่ไม่เป็นโรคกับมะกรูด มี 13 ไอโซเลท

5. การเก็บรักษาเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* ภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 ปี ทุกไอโซเลทยังมีชีวิตและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเหมือนเดิมทุกประการ สามารถเกิดโรคบนพืชอาศัยได้เหมือนเดิมเช่นกัน

ตารางที่ 1 การกระจายของกลุ่มต่าง ๆ ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*citri* ของส้มชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ตามการเกิดโรคบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ 4 ชนิดและตามการใช้น้ำตาล 3 ชนิด

Table 1 Distribution of *Xanthomonas campestris* pv.*citri* in Thailand based on pathogenicity on 4 kinds of hosts and utilized of 3 kinds of carbohydrate.

No.	Culture No.	Host plant	place	Group based on pathogenicity	Group based on utilized of carbohydrate
1	003	Lime	Pathumtani	I	III
2	004	Leech Lime	Pathumtani	I	I
3	057	Lime	Ratchaburi	I	IV
4	058	Lime	Ratchaburi	I I I	IV
5	059	Lime	Ratchaburi	I I I	II
6	069	Leech Lime	Chumphon	I	I
7	070	Leech Lime	Prachuapkhirikhan	I	IV
8	072	Lime	Prachuapkhirikhan	I	III
9	097	Lime	Prachuapkhirikhan	I	III
10	108	Lime	Prachuapkhirikhan	I	III
11	110	Lime	Prachuapkhirikhan	I	III
12	120	Leech Lime	Phetchaburi	I	III
13	161	Leech Lime	Phetchaburi	I	III
14	162	Lime	Nongkhai	I	IV
15	183	Lime	Nakhonpathom	I	III
16	184	Lime	Yala	I	II
17	185	Lime	Yala	I I	III
18	186	Lime	Bangkok	I I	II
19	187	Lime	Nonthaburi	I I	III
20	189	Leech Lime	Sukhothai	I	II
21	207	Tahiti Lime	Kamphaeugphet	I	IV
22	209	Leech Lime	Chiangmai	I	I
23	210	Lime	Tak	I	IV
24	215	Tahiti Lime	Tak	IV	II
25	222	Lime	Tak	I	II
26	224	Lime	Chiangmai	I	IV

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1 (Continues)

No.	Culture No.	Host plant	place	Group based on pathogenicity	Group based on utilized of carbohydrate
27	225	Lime	Chiangmai	I	IV
28	227	Lime	Chiangmai	I	I
29	229	Leech Lime	Chiangmai	I	IV
30	234	Lime	Chiangmai	I	IV
31	235	Tahiti Lime	Chiangmai	I	IV
32	236	Lime	Lampang	I	III
33	238	Lime	Kanchanaburi	I	IV
34	239	Lime	Chiangmai	I	II
35	240	Lime	Ratchaburi	I	II
36	241	Lime	Ratchaburi	I I	III
37	242	Lime	Nakhonpathom	I I	IV
38	243	Lime	Nakhonpathom	IV	III
39	244	Lime	Nakhonpathom	I	IV
40	257	Leech Lime	Nakhonpathom	I	III
41	258	Lime	Chonburi	I	IV
42	259	Lime	Chonburi	I	IV
43	201	Lime	Chachoengsao	IV	II
44	250	Lime	Chachoengsao	I I I	II
45	251	Lime	Chumphon	IV	III
46	313	Lime	Nongkhai	I	III
47	777	Lime	Nakhonrachsima	I I	III
48	064	Sweet orang	Chumphon	I	II
49	067	Pomelo	Prachuapkhirikhan	I I	II
50	158	Neek tangerine	Yala	I	III
51	159	Neek tangerine	Yala	IV	II
52	194	Fremong	Tak	I	II
53	197	Tangerine	Tak	I	II
54	202	Sweet orang	Chiangmai	IV	IV
55	203	Sweet orang	Chiangmai	I	I
56	204	Tangerine	Chiangmai	I	IV

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1 (Continues)

No.	Culture No.	Host plant	place	Group based on pathogenicity	Group based on utilized of carbohydrate
57	230	Pomelo	Nakhonpathom	I	I
58	233	Sweet orang	Nakhonpathom	I	I
59	237	Tangerine	Pathumthani	I	II
60	119	Sweet orang	Ratchaburi	I	II
61	126	Tangerine	Pathumthani	I	IV
66	726	Pomelo	Chiangrai	I	II
67	727	Pomelo	Chiangrai	I	IV
68	694	Pomelo	Bangkok	I	III
69	795	Leech Limee	Nakhonpathom	I	IV
70	805	Pomelo	Bangkok	I I I	IV
71	807	Lime	Phetchaburi	I I	II
72	811	Lime	Bangkok	IV	IV
73	851	Lime	Nakhonrachsima	I I I	III
74	819	Tangerine	Pathumthani	I	II
75	831	Leech Lime	Chantaburi	I	IV
76	834	Pomelo	Nakhonpathom	I	IV
77	837	Lime	Nongkhai	I	IV
78	840	Pomelo	Nakhonpathom	I	IV
79	842	Lime	Nakhonpathom	I	II
80	844	Pomelo	Nan	I	IV
81	855	Pomelo	Pathumthani	I	IV
82	860	Tangerine	Pathumthani	I	IV
83	864	Tangerine	Pathumthani	I	II
84	866	Tangerine	Pathumthani	I	IV
85	860	Tangerine	Pathumthani	I	IV
86	869	Pomelo	Pathumthani	I	IV
87	870	Tangerine	Pathumthani	I	IV
88	873	Tangerine	Pathumthani	I	IV
89	874	Pomelo	Pathumthani	I	IV
90	875	Tangerine	Pathumthani	I	IV

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1 (Continues)

No.	Culture No.	Host plant	place	Group based on pathogenicity	Group based on utilized of carbohydrate
91	876	Tangerine	Pathumthani	I I	IV
92	878	Tangerine	Pathumthani	IV	IV
93	880	Orange	Pathumthani	I I	II
94	881	Sweet orange	Phichait	IV	IV
95	884	Pomelo	Phichait	IV	IV
96	886	Lime	Phichait	I I	II
97	892	Lime	Sukhothai	I I	II
98	897	Tahiti Lime	Sukhothai	I I	II
99	902	Pomelo	Chiangrai	I	IV
100	904	Mandarin	Chiangrai	I I	IV
101	920	Lime	Chanthaburi	IV	II
102	923	Tahiti Lime	Chanthaburi	I	II
103	925	Tahiti Lime	Chanthaburi	I	II
104	929	Lime	Pathumthani	I	I
105	931	Tangerin	Pathumthani	I	II
106	933	Lime	Pathumthani	I I	II
107	936	Grape Fruit	Pathumthani	I	IV
108	937	Fremont	Pathumthani	I	IV
109	939	Pomelo	Pathumthani	I	I
110	943	Tangerinf	Nan	I	II
111	944	Tahiti Lime	Nan	I	II
112	946	Lime	Nan	IV	IV
113	950	Fremont	Chiangmai	I	IV
114	956	Lime	Mukdahan	I	II
115	957	Lime	Nakhonpathom	I	III
116	958	Lime	Mukdahan	I	II
117	963	Lime	Chonburi	I	I
118	965	Lime	Chonburi	I	IV
119	967	Leech Lime	Chonburi	I	I
120	968	Leech Lime	Chonburi	I	IV

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1 (Continues)

No.	Culture No.	Host plant	place	Group based on pathogenicity	Group based on utilized of carbohydrate
121	970	Lime	Nakhonnayok	I	II
122	982	Pomelo	Pathomtani	I	IV
123	986	Lamon	Bangkok	I	II
124	987	Pomelo	Phichit	I	IV
125	992	Pomwlo	Phichit	I	IV
126	993	Lime	Pathomtani	I	II
127	996	Lime	Pathomtani	I	IV
128	1000	Lime	Nakhonpathom	I	II
129	1007	Lime	Phetchaburi	I	IV
130	1008	Lime	Phetchaburi	I	III
131	1009	Lime	Phetchaburi	I	IV
132	1010	Pomelo	Nakhonsithamarat	I	I
133	1012	Lime	Pathomtani	I I	I
134	1013	Lime	Khonkaen	I	I
135	1014	Lime	Khonkaen	I I	I
136	1015	Lime	Khonkaen	I I	IV
137	1016	Lime	Sukhothai	I I	I
138	1017	Pomelo	Chiangrai	IV	I
139	1039	Leech Lime	Nonthaburi	I	III
140	1040	Leech Lime	Nonthaburi	I	IV
141	1041	Leech Lime	Nonthaburi	I	IV
142	1042	Lime	Nakhonpathom	I I	I
143	1043	Lime	Pathomtani	I I	I
144	1044	Pomelo	Pathomtani	I	II
145	1045	Leech Lime	Pathomtani	I	I
146	1046	Fremont	Bangkok	I	I
147	1047	Pomelo	Pathomtani	I	IV
148	1048	Lime	Bangkok	I I I	II
149	1049	Lime	Nonthaburi	I	II
150	1054	Lime	Bangkok	I	III

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Table 1 (Continues)

No.	Culture No.	Host plant	place	Group based on pathogenicity	Group based on utilized of carbohydrate
151	1055	Leech Lime	Phichit	I	III
152	1056	Lime	Nonthaburi	I	II

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางชีวเคมีระหว่างสายพันธุ์ของแคงเกอร์จากประเทศไทย

Table 2 Physiological and biochemical properties between strain of Canker from Thailand.

Organism Characteristics	Strain of Canker (Thailand)
Gram strain	-
Spore formation	-
Flagellation (l Polar)	+
O/F test	0
Hydrolysis of Starch	+
Hydrolysis of Tween 80	+
Hydrolysis of Casein	+
Liquefaction of Gelatin	+
Hydrolysis of Arginine	-
Production of lecithinase	+
Hydrolysis of aesculin	+
Gluconate test	-
Reduction of nitrate	-
Production of tyrosinase	+
Production of Urease	-
Production of hydrogen sulphide	+
Methyl red test	-
Production of Acetoin	-
Litmus milk reaction	P
Tolerance to NaCl 3%	+
5%	+
7%	+

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Table 2 (Continues)

Organism Characteristics	Strain of Canker (Thailand)
Growth at 36^0C	+

Symbol F = Fermentation , O = Oxidation

V = Strain variable

B = Alkali

P = Peptonization

ตารางที่ 3 ความสามารถในการใช้น้ำตาลระหว่างสายพันธุ์ของแคงเกอร์จากประเทศไทย

Table 3 The ability to utilized carbohydrates between stratn of Canker from Thailand.

Organism Characteristics	**Strain of Canker (Thailand)**
Utilization of	
Arabinose	
Rhamnose	v
Xylose	+
Glucose	+
Fructose	+
Galactose	+
Mannose	+
Maltose	+
Lactose	+
Trehalose	+
Sucrose	+
Raffinose	-
L-methyl-D-ghucoside	-
Balicin	v
Sorbitol	v
Inositol	-
Dulcitol	-
Glycerol	+
Mannitol	+
Inulin	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Table 2 (Continues)

Organism Characteristics	Strain of Canker (Thailand)
Glycogen	+
Dextrin	+
Starch	+
Gluconete	-
Oxalate	-
Acetrate	-
Tartrate	-
Malonate	+
Citrate	+
Succinate	+
Malate	+

V = Variable

ตารางที่ 4 การแบ่งกลุ่มของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *citri* โดยใช้น้ำตาล 3 ชนิด

Table 4 Grouping of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* in Thailand based on 3 kinds of carbohydrate.

Group	Rhammose	Szlicin	Sorbital	Number of isolates
I	+	+	+	23
II	-	-	-	44
III	-	+	+	25
	-	+	-	
	+	+	-	
IV	-	-	+	60
	+	-	+	
	+	-	-	

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างส้มตระกูลต่าง ๆ กับเชื้อกลุ่มต่างๆ

Table 5 Relationship between citrus different host and bacterial groups

Group	Lime	Leech lime	Pomelo	Sweet orange	Number of isolates
I	+	+	+	+	111
I I	+	+	+	-	22
I I I	+	+	-	-	6
IV	+	-	+	+	13

+ = Canker appeared on inoculated leaf

- = Canker not appeared on inoculated leaf

เอกสารอ้างอิง

วิวัฒน์ แดงสุภา , 2510 , การศึกษาเบื้องต้นโรคแคงเกอร์ของส้ม . วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ . กรุงเทพฯ

อำไพวรรณ ภราดรนุวัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, วิเชียร กำจายภัย, สุพัฒน์ อรรถธรรม และนิพนธ์ ทวีชัย , 2527 , โรคส้มในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. พันนีพับลิชชิง , กรุงเทพฯ. 126

Brunings, A.M. and D.W. Gabriel. 2003. *Xanthomonas citri*: breaking the surface. Mol. Plant Path. 4, 141–157.

Dye , D.W. , J.F. Bradbury , M. Goto , A.C. Hayward , R.A. Lelliolt and M.N.Schroth. 1980. International standard for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of pathovar names and pathotype Strain. Rev. Plant Pathol. 19:153 – 168.

Fawcett , N.S. 1936. Citrus Disease and Their Control. 2d ed. , Mc Grow – Hill Book Co. , Inc. New York. 656 p.

Goto , M. , T. Takahashi ,and M.A. Massina. 1980. Comparative study to the strains of *Xanthomonas campestris pv. citri* isolated from citrus canker in Japan and cancresis B in Argentina. Phytopath. Soc Japan 46 ; 329 – 338.

Hugh , R. and N. Loifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram – negativebacteria. Journal of Bacteriology. 66 : 24 – 26.

Lelliott R.A. and D. E. Stead. 1987. Methods for the Dianosis of Bacterial Discases of Plants. Dlack well Scientific Publications, Oxford. 216 pp.

Mc Clung , L.S. , and R. Toabe. 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of Clostridium saporogenes and certain species of the gangrene and botulinum groups. J. Bacterial. 53 : 139 – 147.

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

Schoulties , C.B. , E.L. Civerolo , Miller , R.E. Stall , C. J. Krass , S.R. Poc and S.P. Oucharmo. 1987. Citrus canker in Florida. Plant Dis. 71: 388 – 395.

Smibert , R.M. , and N.R. Krieg. 1981. General characterization. pp. 409 – 443. *In* E.W. Nestor (ed.). Manual of Method for General Bacteriology. American Society of Microbiology , Washington , D.C. 524 pp.

Thornley , M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram -Negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology 23 : 37 – 52.

ศึกษาชนิด race , ชนิด biovar, การตอบสนองต่อปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาและวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *Pseudomonas* (*Ralstonia*) *solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย

Study on Biovar Type, Physiological Race, Serology Reaction and Culture Preservation of *Pseudomonas (Ralstonia*) *solanacearum* Causal Bacterial Wilt of Several Economic Crops in Thailand.

วงศ์ บุญสืบสกุล

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล **รุ่งนภา คงสุวรรณ์**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

ศึกษาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จำนวน 115 ไอโซเลท ที่แยกจากตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจ 17 ชนิด และวัชพืช 1 ชนิด จาก 21 จังหวัดของประเทศไทย แยกเชื้อดังกล่าวชนิดรุนแรงต่อโรคด้วยอาหาร TTC ซึ่งเชื้อที่แยกได้นำมาทดสอบ hypersensitivity reaction และปลูกเชื้อกลับไปยังพืชอาศัยเดิมหรือพืชที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อนี้เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรค ตามหลักการพิสูจน์โรค Koch's postulation จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีกับน้ำตาล 6 ชนิด เพื่อหาชนิดของ biovar และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่น ๆ 7 ชนิดเพื่อหาชนิดของ race จากการทดลองพบว่าเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จาก หน้าวัว 4 ไอโซเลท, กระเพรา 1 ไอโซเลท, พริกขี้หนู 4 ไอโซเลท, ปทุมมา 2 ไอโซเลท, ยูคาลิปตัส 1 ไอโซเลท, ขิง 4 ไอโซเลท, ถั่วลิสง 1 ไอโซเลท, ดาวเรือง 4 ไอโซเลท, พริกชี้ฟ้า 2 ไอโซเลท, มันฝรั่ง 3 ไอโซเลท, งา 2 ไอโซเลท, ยาสูบ 5 ไอโซเลท มะเขือเทศ 6 ไอโซเลท, มะเขือเปราะ 3 ไอโซเลท และวัชพืชหญ้ายาง 3 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3**,** ปทุมมา 4 ไอโซเลท, มะเขือยาว 7 ไอโซเลท, ขิง 6 ไอโซเลท, ถั่วลิสง 6 ไอโซเลท, พริกชี้ฟ้า 7 ไอโซเลท, มันฝรั่ง 24 ไอโซเลท, มะเขือเปราะ 4 ไอโซเลท และผักบุ้ง 2 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4 และพริกขี้หนู 1 ไอโซเลท, พริกชี้ฟ้า 1 ไอโซเลท และมันฝรั่ง 7 ไอโซเลท เป็น race 3 biovar 2A

รหัส 44 11 002 002

การทดสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่งทดสอบกับเชื้อดังกล่าวที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอื่น ๆ ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าแอนติซีรัมจากมันฝรั่งสามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับสูงต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคนี้กับมะเขือเทศ มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริกขี้หนู พริกเหลือง พริกชี้ฟ้า ยาสูบ งาและผักบุ้ง เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับกลางต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืช หน้าวัว กระเพรา ปทุมมา ขิง ถั่วลิสงและ ดาวเรือง และเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับอ่อน กับเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชยูคาลิปตัสและวัชพืชหญ้ายาง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อที่ใช้เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ

การศึกษาการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืช 5 ชนิดครอบคลุม 3 ชนิด biovar ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บใต้ mineral oil และการเก็บแบบ freeze dry ที่อุณหภูมิ 4° ซ, 10-14° ซ และ 30° ซ นำมาตรวจหาความมีชีวิตของเชื้อบนอาหาร PSA ภายในระยะเวลา 3 ปี พบว่าความมีชีวิตของเชื้อดังกล่าวที่เกิดโรคกับพืชชนิดต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันในแต่ละ พืชอาศัยและแต่ละกรรมวิธีโดยเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกไอโซเลทสามารถมีชีวิตอยู่ได้อย่างน้อย 3 ปียกเว้นกรรมวิธีการเก็บใต้ mineral oil ที่ 30° ซ พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* race 3 biovar 2 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 18 เดือน, race 1 biovar 4 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 23 เดือน และrace 1 biovar 3 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 27 เดือน ผลที่ได้จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าการเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 30° ซ ในระยะเวลา 3 ปี เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวที่สะดวกและประหยัดที่สุด

คำนำ

Ralstonia solanacearum (Yabuuchi *et al.* 1995) ซึ่งชื่อเดิมว่า *Pseudomonas solanacearum* เป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว (bacterial wilt) ที่ระบาดทำความเสียหายแก่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดทั้งในเขตร้อน, เขตกึ่งร้อนและเขตอบอุ่นตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เชื้อนี้มีพืชอาศัยมากกว่า 50 วงศ์ ในพืชต่างๆมากกว่า 200 species มีทั้งพืชผัก, พืชหัว, ไม้ดอกไม้ประดับ, ไม้ผล, ไม้ยืนต้น, พืชสมุนไพรและวัชพืช เช่น มันฝรั่ง , มะเขือเทศ, มะเขือยาว, พริก, หอมหัวใหญ่, ถั่วลิสง, แตง, ขิง, มันเทศ, ผักกาดหัว radish, มันสำปะหลัง, ทานตะวัน, ปักษาสวรรค์, geranium, กล้วย, กล้วยประดับ, มะละกอ, สตรอเบอรี่, ปทุมมา, กระเพรา, ข่า, หม่อน, สะเดา, มะกอก, ยูคาลิปตัส, อเล็กซานดราปาล์ม, asterac weed และอื่นๆ (Hayward, 1994) เนื่องจากเชื้อนี้มีพืชอาศัยกว้างมาก นักวิทยาศาสตร์จึงได้จัดแบ่งกลุ่มของเชื้อนี้ออกเป็น 5 race คือ race1 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างขวาง ได้แก่ เชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในถั่วลิสง, ขิง, มะกอก, ยาสูบ, มันฝรั่ง, มะเขือเทศ และกล้วย (2n) เป็นต้น race 2 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยเฉพาะในพืชตระกูลกล้วย (Musaceous) ได้แก่ กล้วยประดับเช่นพวก *Heliconia spp*. และ triploid banana (*Musa* AAA) race 3 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยค่อนข้างจำกัดกับพืชพวกมันฝรั่งและมะเขือเทศ race 4 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยเฉพาะในพืชพวกหม่อน และ race 5 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกับขิง (Buddenhagen *et al.*,1962; Pegg and Moffett, 1971; He *et al.*, 1983) แม้ว่าความจำเพาะต่อ

พืชอาศัยจะไม่เป็นคุณสมบัติที่ใช้ในทางอนุกรมวิธานของเชื้อจุลินทรีย์แต่ระบบ race ก็ได้รับการพิสูจน์และยอมรับในการใช้จัดกลุ่มของเชื้อนี้ (Cook *et al*., 1989) Hayward (1964) ได้จำแนกชนิดของเชื้อนี้ออกเป็น 4 biovar ตามคุณสมบัติของปฏิกิริยาการสร้างกรดจาก disaccharide 3 ชนิด (maltose, lactose และ cellobiose) และ hexose alcohol 3 ชนิด (mannitol, sorbitol และ dulcitol) He *et al.* (1983) รายงานว่าพบความแตกต่างในการสร้างกรดจากน้ำตาล disaccharide ชนิด cellobiose ที่แตกต่างจาก biovar 4 และเสนอให้เป็น biovar 5 ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง race และ biovar Buddenhagen (1985) ได้รายงานว่า race 3 ส่วนมากจะเป็น biovar 2 เท่านั้นและเชื้อนี้จะจำกัดพืชอาศัยเฉพาะกับมันฝรั่ง, มะเขือเทศและมันฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองที่พบในแถบเทือกเขาแอนเดียสในทวีปอเมริกาใต้เท่านั้น Palleroni และ Doudoroff (1971) ได้รายงานว่า race1 ที่มีพืชอาศัยกว้างขวางส่วนมากจะพบว่าเป็น biovar 1,3 และ 4 เท่านั้น ขณะที่ race 2 จะมีแต่ biovar1

การศึกษาทางเซรุ่มวิทยาเกี่ยวกับเชื้อนี้ Seal และ Elphinstone (1994) ได้รายงานว่าการตรวจหาเชื้อนี้โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยามีประโยชน์อย่างมากกับงานทางด้านกักกันพืชเพราะสามารถตรวจหาเชื้อนี้ได้ในส่วนต่างๆของพืชที่มีการนำเข้าและส่งออกทั้งที่ไม่ปรากฏอาการของโรคให้เห็นโดยใช้กับพืช มันฝรั่ง มะเขือเทศ ขิง และกล้วย ทั้งนี้ได้แสดงความคิดเห็นไว้ว่าสำหรับการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* *นี้ต้องการข้อมูลในทางลึกเกี่ยวกับ การตรวจหาเชื้อที่ติดมากับพืชโดยที่ไม่แสดงอาการโรค* (Latent infection) *ด้วยแอนติบอดี้ที่มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อนี้สูงกว่านี้* ควบคู่ไปกับการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น มีรายงานการผลิตแอนติซีรัมชนิด polyclonal antibody ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมันฝรั่งในประเทศไทย (วงศ์, 2538) และสามารถนำแอนติซีรัมนี้มาตรวจหาเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* ในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ (วงศ์, 2538) นอกจากนี้ยังได้นำแอนติซีรัมดังกล่าวมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นชุดตรวจสอบ ELISA kit ที่ในการตรวจหาเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* นอกห้องปฏิบัติการ (วงศ์, 2539)

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สาเหตุโรคพืชที่สำคัญ เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นหลักฐานอ้างอิงและศึกษาวิจัยในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนั้น ๆ นอกจากนี้ยังใช้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงของประชากรเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชภายในประเทศอีกด้วย การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชเพื่อให้มีชีวิตยืนนานโดยลักษณะทางพันธุกรรมและคุณสมบัติต่าง ๆ ไม่เปลี่ยนแปลง การย้ายเชื้อเปลี่ยนหลอดอาหารบ่อย ๆ จะทำให้คุณสมบัติบางอย่างของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสูญเสียไป โดยเฉพาะการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยและลักษณะสัณฐานวิทยาบางอย่างเปลี่ยนแปลงทำให้เกิดการจำแนกที่ผิดพลาด (Dhingra and Simclair, 1985) วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมีหลายวิธีการ ได้แก่ การเก็บรักษาไว้ภายใต้น้ำมัน (Zensen *et al.*, 1944; Graham, 1952) วิธีเก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเก็บไว้ได้นาน 2-3 ปี (Devay and Schnathorst, 1963; Kelman and Person, 1961) เก็บด้วยวิธี 15% glycerol ใน Deep freezing (Quadling, 1960, Sleemsman and Leben, 1978) Quadling (1960) ได้รายงานสามารถเก็บรักษาเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *phascoli* และ *Erwinia spp.* และ *Pseudomonas spp*. ไว้ได้นาน 18 เดือนที่อุณหภูมิ -20^0 ซ Sleesman and Leben (1978) รายงานการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ

โรคพืชได้ 2 ถึง 3 ปีที่อุณหภูมิ -70^0 ซ และสุดท้ายวิธี Lyophilization เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการเก็บระยะยาว (long-term preservation) (Dhingra and Sinclair, 1985) ได้มีรายงานวิธีการ Lyophilization สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้เป็นระยะเวลามากกว่า 10 ปี (Proom and Hemmons, 1949; Stark and Hemington, 1931)

ในการทดลองนี้จะได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีตามหลักการของ Hayward และความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่น ๆ มีวัตถุประสงค์ เพื่อจำแนกชนิด biovar (biovariety type or biovar type) และชนิด race (physiological race) ของเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานวิจัยอื่น ๆ ต่อไป และทำการทดสอบแอนติซีรัมที่ผลิตจากเชื้อ *R. solanacearum ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับมันฝรั่งโดยนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่ม วิทยากับเชื้อนี้ในพืชอาศัยอื่น ๆ* มีวัตถุประสงค์*เพื่อให้ทราบว่า*แอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อดังกล่าว*จะสามารถนำมาปรับใช้กับเชื้อเดียวกันนี้ที่เกิดโรคกับพืชอื่น ๆ ได้หรือไม่ นอกจากนี้จะได้ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับเชื้อ R. solanacearum เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนักวิชาการที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อนี้และสามารถนำที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ ในการทดลองนี้ประกอบด้วยอุปกรณ์โดยภาพรวมดังนี้

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียที่พบระบาดในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย TTC (Triphenyltetrazolium chloride media), มันฝรั่งและสารเคมีต่างๆที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น Peptone หรือ Polypeptone, $NH_4H_2PO_4$, KCL, $MgSO_4.7H_2O$, Bromothymol blue และวุ้นผง เป็นต้น
3. เครื่องมือสำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียง หลอดทดลองธรรมดาและชนิดฝาเกลียว จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แอลกอฮอล 70 % เครื่องกรองและกระดาษกรองเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น
4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ เช่น 28-30^{o}ซ, 4^{o}ซ, 10^o-14^o ซ และ 30^{o}ซ
5. เครื่องเขย่าทั้งชนิด Vortex mixer และ Rotary shaker ที่สามารถปรับความเร็วรอบได้
6. ต้นยาสูบพันธุ์ Blight yellow no.4 สำหรับทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองแบบเฉียบพลัน
7. โรงเรือนสำหรับปลูกพืชทดลองและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะปลูก เช่น ดิน ตู้อบดิน กระถาง ถุงพลาสติก พลั่วตักดิน ตาชั่งดิน ระบบการให้น้ำ เป็นต้น
8. เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ Hitachi 160.E สำหรับวัดความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย
9. ต้นพืชที่ใช้ในการทดสอบการเกิดโรคได้แก่ มันฝรั่ง (พันธุ์ May queen), มะเขือเทศ (พันธุ์ LS.89), ถั่วลิสง (พันธุ์ Chiba hanryu หรือ Nakadate), ยาสูบ (พันธุ์ Bright yellow no.4), พริก (พันธุ์ Wase green), มะเขือยาว (พันธุ์ Senryu 2 gou) และ ขิง (พันธุ์Roscoe)

10. สารน้ำตาลคาร์โบไฮเดรทสำหรับการทดสอบการสร้างกรด ได้แก่ D-glucose, maltose, lactose, cellobiose, mannitol, sorbitol และ dulcitol
11. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับทำ Indirect ELISA เช่น primary antiserum เป็น polyclonal antibody ที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อ *R.solanacearum* ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง, ELISA reader, carbonate buffer, Washing buffer ชนิด PBS-T, Mini washing Danatech laboratory Inc, ABC-kit (Avidin-biotinylated enzyme complex ของ Vector laboratory Inc., APH (Avidin conjugate with enzyme peroxidase complex dilute with hydrogenperoxide), สารที่ทำให้เกิดสี (substrate) ABTS(2,2-azino-di-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate และหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS sodium dodecyl sulfate เป็นต้น
12. เชื้อ *R. solanacearum* ที่ใช้ศึกษาการเก็บรักษาเชื้อมีจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ มันฝรั่ง race 1 biovar 3, มันฝรั่ง race 1 biovar 4, มันฝรั่ง race 3 biovar 2, พริก race 1biovar 3, มะเขือเทศ race 1 biovar 3, ปทุมมา race 1 biovar 4, และขิง race 1 biovar 4
13. อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆทางโรคพืชวิทยา เช่น ถุง, มีด, กรรไกรและถังแช่เย็นสำหรับเก็บตัวอย่างโรค, โกร่งบดตัวอย่าง, ตู้อบฆ่าเชื้อ, เตาอบฆ่าเชื้อ ห้อง clean room ที่ติดตั้งแสงสำหรับฆ่าเชื้อ และอื่น ๆ
14. เครื่อง Lyophilizer สำหรับทำ freeze dry

วิธีการ

การเตรียมเชื้อ *R. solanacearum* เพื่อใช้ในการทดลอง

<u>การแยกเชื้อบริสุทธิ์ *R. solanacearum*</u>

เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคเหี่ยวเขียวในเขตภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ตะวันตกและภาคกลางของประเทศไทย นำตัวอย่างต้นพืชที่เป็นโรคมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร TTC (Triphenyltetrazolium chloride media) (Kelman, 1954) โดยวิธี streak plate isolation technique จาก bacterial ooze suspension โดยการตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคตรงบริเวณลำต้นเหนือผิวดิน 2-3 ซม.นำมาล้างด้วยน้ำประปาเปิดไหลจากก๊อกให้สะอาดแล้วฆ่าเชื้อที่ผิวโดยการจุ่มในแอลกอฮอล 70 % นาน 2-3 นาที จากนั้นนำไปแกว่งล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ตัวอย่าง 2-3 ชิ้นในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5-10 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในท่อน้ำท่ออาหารของพืชจะค่อย ๆ ไหลออกมาอยู่ในน้ำ ภายใต้ aseptic technique ใช้เข็มเขี่ยชนิด loop แตะน้ำเชื้อข้างต้นนำมาลากบนอาหาร TTC โดยเทคนิกที่กล่าวข้างต้นเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony isolation) จากนั้นเก็บในตู้ 30° ซ นาน 2-3 วัน เลือกเก็บโคโลนี เดี่ยวที่มีลักษณะรีหรือค่อนข้างกลมนูนเล็กน้อยสีขาวคล้ายน้ำนมเป็นมันเยิ้มและมีตะกอนสีชมพูสะสมอยู่ตรงกลางโคโลนี ย้ายเชื้อด้วยเข็มเขี่ยที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วโดยแตะเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวมาเลื้องในหลอดอาหารเอียง PSA (Potato synthetic agar, Wakimoto's media) เก็บในตู้ 30° ซ นาน 2-3 วัน เชื้อจะขึ้นอย่างสม่ำเสมอเต็มผิวหน้าอาหาร

PSA ย้ายเชื้อ 2 ลูปด้วย aseptic technique ใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มล.ที่อยู่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว เสร็จแล้วเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเป็นแหล่งเชื้อ (stock culture) ที่ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

การทดสอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบ(Hypersensivity reaction, HR)

HR-test ทำการทดสอบกับใบแก่ของยาสูบพันธุ์ Blight yellow no.4 ปลูกในโรงเรือนที่ให้แสงสลับมืด 12 ชม.ที่อุณหภูมิ 28° ซ โดยเตรียมสารละลายเชื้อ *R. solanacearum* จากโคโลนีเดี่ยวตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นและปรับความเข้มข้นที่ 10^8 cfu. ต่อ มล. โดยเทียบจากการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Hitachi 160.E) optical density = 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ฉีดสารละลายเชื้อ 0.3-0.5 มล. เข้าเนื้อเยื่อใบด้านใต้ใบใบยาสูบด้วยไซริ้งขนาด 5 มล. จนได้รอยฉ่ำน้ำพื้นที่ 1-2 ตารางเมตร ปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบต่อเชื้อที่ใช้ทดสอบจะแสดงให้เห็นเป็นแผลไหม้สีน้ำตาล (consisted of confluent collapse) หรือเป็นจุดสีน้ำตาล (necrotic lesion) ภายใน 24-48 ชม. แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบ (+) แต่ถ้ารอยฉ่ำน้ำนั้นกลับเป็นปกติแสดงว่าไม่เกิดปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบ (-) ซึ่งเชื้อสาเหตุโรคพืชจะให้ปฏิกิริยา HR-test เป็นบวก การทดลองนี้ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ

การปลูกเชื้อกลับยังพืชที่พบโรคหรือพืชอาศัยอื่นเพื่อยืนยันเชื่อสาเหตุโรคพืช (Pathogenicity test)

ปลูกพืชทดสอบในดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในถุงพลาสติกดำขนาด 4x4 นิ้ว (เส้นผ่าศูนย์กลางxความสูง) 1 ต้นต่อ 1 ถุง เมื่อต้นพืชอายุได้ 2-3 สัปดาห์หลังจากงอก ใช้ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ได้จากวิธีการดังกล่าวข้างต้นนำมาจิ้มแทงเนื้อเยื่อของลำต้นบริเวณใกล้ ๆ ผิวดิน (Kelman,1954) ทำ 3 ต้นต่อ 1 ไอโซเลท ตรวจผลการเกิดโรคโดยต้นพืชจะแสดงอาการเหี่ยวของพืชให้เห็นภายใน 2 สัปดาห์ ยกเว้นกรณีของถั่วลิสงและขิงจะแสดงอาการโรคภายใน 3-6 สัปดาห์ กรรมวิธีเปรียบเทียบ จะใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแทนเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ในกรณีของเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จาก หน้าวัว กระเพรา ยูคาลิตัส ดาวเรือง งา ผักบุ้ง และวัชพืช หญ้ายาง จะใช้พืชอาศัยอื่นพืชใดพืชหนึ่งทดสอบแทนได้แก่ มะเขือเทศ มะเขือยาว ถั่วลิสง หรือ พริก เป็นต้น

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่นๆเพื่อจำแนกชนิด race

พืชอาศัยอื่น ๆ (collateral hosts) ของเชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ มันฝรั่ง (พันธุ์ May queen), มะเขือเทศ (พันธุ์ LS.89), ถั่วลิสง (พันธุ์ chiba hanryu หรือ Nakadate), ยาสูบ (พันธุ์ Bright yellow no.4), พริก (พันธุ์ Wase green), มะเขือยาว (พันธุ์ Senryu 2 gou) และขิง (พันธุ์ Roscoe) ถูกปลูกในสภาพเดียวกับการทดลองการปลูกเชื้อเพื่อการพิสูจน์โรคที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (Pathogenicity test) สำหรับวิธีการปลูกเชื้อและการตรวจผลการเกิดโรคก็ใช้วิธีการและระยะเวลาเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วเช่นกัน การให้คะแนนการเกิดโรค (Disease rating) ใช้ตามมาตรฐานการแสดงอาการโรคเหี่ยวของศูนย์วิจัยมันฝรั่ง

นานาชาติดังนี้ **0** = ไม่เกิดโรค (healthy), **1** = 1-2 ใบล่างแสดงอาการเหลืองหรือเหี่ยว (1-2 leaves yellowish or wilt), **2** = 3-4 ใบล่างแสดงอาการเหลืองหรือเหี่ยว (3-4 lower leaves wilt), **3** = ครึ่งต้นแสดงอาการเหี่ยว (half plant wilt), **4** = ¾ ของต้นแสดงอาการเหี่ยว (¾ plant wilt) และ **5 =** ทั้งต้นแสดงอาการเหี่ยวหรือตาย (whole plant wilt or death) (Martin and French, 2000)

การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิด biovar

ทำตามหลักการของ Hayward, (1964; 1991) โดยเตรียมอาหารพื้นฐาน (Basal media) ของ Ayer, Rupp and Johnson เพื่อทดสอบปฏิกิริยาการสร้างกรด ซึ่งในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย Peptone หรือ Polypeptone 1.0 กรัม, $NH_4H_2PO_4$ 1.0 กรัม, KCL 0.2 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม, Bromothymol blue 0.08 กรัม และวุ้นผง 3.0 กรัม นำไปหลอมให้วุ้นละลายแล้วนำมาปรับค่า pH. ที่ 7.0 – 7.1 ด้วย 40 % NaOH ทำให้สีของอาหารที่ได้เป็นสีเขียวมะกอกจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121° ซ นาน 20 นาที

การเตรียมสารละลายน้ำตาลคาร์โบไฮเดรท (D-glucose, maltose, lactose, cellobiose, mannitol, sorbitol, dulcitol) 1 %ในอาหารพื้นฐาน โดยเตรียมสต๊อกสารละลายน้ำตาลคาร์โบไฮเดรท 10 % ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 10 มล.ใส่ผสมกับอาหารพื้นฐานปริมาตร 90 มล.ที่ 50°-55° ซ โดยน้ำตาล D-glucose, mannitol, sorbitol และ dulcitol สามารถนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121° ซ แต่สำหรับ maltose, lactose, cellobiose ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระกรองแบคทีเรียขนาด 0.20 μm. จากนั้นดูดอาหารน้ำตาลที่เตรียมเสร็จแล้วปริมาตร 3 มล. ใส่ในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 ซม. เก็บไว้ที่ 4° ซ . เพื่อไว้ใช้สำหรับทดลองต่อไป

การทดสอบเชื้อกับอาหารน้ำตาลที่เตรียมไว้ข้างต้นโดยใช้เข็มเขี่ยแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *R. solanacearum* แต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงบนอาหาร TTC 2-3 วัน สแตบลงในอาหารน้ำตาลแต่ละชนิดแล้วเททับผิวหน้าด้วยอาหารวุ้นผง 5 % ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยมีอาหารที่ไม่ใส่น้ำตาลเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ และมีอาหารน้ำตาล D-glucose เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวก เก็บไว้ที่ 28°-30° ซ เพื่ออ่านปฏิกิริยาการสร้างกรดโดยตรวจผลที่ 3, 7, 14, 21 และ 28 วัน ถ้าเกิดการสร้งกรดในอาหารที่ใช้ทดลองอาหารจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองซึ่งอ่านผลของปฏิกิริยาเป็นบวก (+) และการเปลี่ยนสีจะเริ่มจากส่วนบนของอาหารเลื่อยลงมาด้านล่างของอาหาร แต่ถ้าไม่สร้างกรดในอาหารที่ใช้ทดลอง .อาหารจะไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนสีเล็กน้อยแต่ยังเป็นสีเขียวอยู่ซึ่งอ่านผลของปฏิกิริยาเป็นลบ (-) การจำแนกชนิดของ biovar ตามปฏิกิริยาการสร้างกรดได้ดังนี้ biovar 1 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcohol (mannitol, sorbitol, dulcitol) และ Disaccharide (maltose, lactose, cellobiose) biovar 2 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcohol แต่สร้างกรดในน้ำตาล Disaccharide biovar 3 สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcoholและในน้ำตาล Disaccharide และ biovar 4 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล Disaccharide แต่สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcohol ในทำนองเดียวกัน กรณีที่เป็นbiovar 2 จะทำการทดลองต่อกับคาร์โบไฮเดรทอื่น ๆ อีกได้แก่ ribose, trehalose, tryptophane และ

tartaric เพื่อหาว่าเป็นชนิด 2A หรือ 2T โดยชนิด 2A จะไม่สร้างกรด ส่วนชนิด 2T จะสร้างกรดในคาร์โบไฮเดรทดังกล่าว

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum*

ตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยต่าง ๆ 17 ชนิด ด้วย แอนติซีรัมของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่งโดยทำการทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA ใน microtiter plate ด้วย substrate p-nitrophenyl phosphate แล้วอ่านผลด้วย ELISA reader

วิธีการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี Indirect ELISA

ผสมสารละลายเชื้อ *R.solanacearum* ที่เตรียมไว้ตามคำอธิบายข้างต้นปริมาตร 4.5 มล. ด้วยสารละลาย coating buffer ชื่อว่า carbonate buffer ชนิด 10x ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดใส่ในหลุมของจานอีไลซ่าชนิดโพลีซอร์ปขนาด 96 หลุม โดยใส่ตัวอย่างละ 2 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้ 37° ซ นาน 4 ชม. หรือ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4° ซ จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T โดยใส่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม และล้างด้วยเครื่องล้าง Mini washing Danatech laboratory Inc, USA ทำ 3 ครั้งแต่ละครั้งใช้เวลา 30 วินาที แล้วคว่ำเคาะจานอีไลซ่าบนกระดาษสะอาดหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นจะทำต่อหรือจะเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ ก็ได้ โดยนำมาทำกับชุดตรวจสอบแบบสำเร็จเรียกว่า ABC-kit (Avidin-biotinylated enzyme complex ของ Vector laboratory Inc.) เริ่มด้วยการบล็อกด้วย blocking buffer 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 60 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น จากนั้นใส่ primary antiserum (polyclonal antibody ที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง) ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเดียวกับที่ได้จากการหาค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม โดยใส่ในปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 1-2 ชม. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น แล้วใส่ secondary antiserum ซึ่งเป็น IgG conjugate with biotin ที่อยู่ในชุดสำเร็จปริมาตร 1 หยดต่อ PBS 15 มล. แล้วดูดปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 45 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร APH (Avidin conjugate with enzyme peroxidase complex dilute with hydrogenperoxide) ที่อยู่ในชุดสำเร็จดังกล่าวปริมาตร 1 หยดต่อหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร ABTS (2,2-azino-di-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ หรือเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารในหลุมที่เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเขียว ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที ซึ่งสังเกต ได้จากสีของกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็นสีเหลืองทอง ชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) จากนั้นนำมาอ่านด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่าตั้งค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้มีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็น homologous immunogen ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นที่ใช้ฉีดเข้าสัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัมด้วยอัตราความเข้มข้นเดียวกับ

สารละลายเชื้อข้างต้น และมีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบเป็น น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ , carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer, BSA และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้แก่ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefacian,* และ *Xanthomonas camprestis* pv.*incoanae*

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum*

เชื้อ *R. solanacearum* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่

1. มันฝรั่ง race 1 biovar 3
2. มันฝรั่ง race 1 biovar 4
3. มันฝรั่ง race 3 biovar 2
4. พริก race 1 biovar 3
5. มะเขือเทศ race 1 biovar 3
6. ปทุมมา race 1 biovar 4
7. ขิง race 1 biovar 4

โดยถ่ายเชื้อจาก stock culture ของแต่ละเชื้อลงบนจานอาหาร TTC แล้วเก็บที่ 28° ซ นาน 2-3 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อนี้ตามที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น ย้ายโคโลนีเดี่ยวของเชื้อใส่หลอดอาหารเอียง PSA เลี้ยงไว้ที่ 28° ซ นาน 24-48 ชม เมื่อเชื้อขึ้นเต็มหลอดก็ย้ายเชื้อเพื่อทดสอบการเก็บรักษาเชื้อใน 3 กรรมวิธี ได้แก่ กรรมวิธี ที่1 ใส่เชื้อดังกล่าวในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียว 2 ลูปเต็ม ต่อหลอด ปั่นเชื้อให้ละลายใน น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาเกลียวให้แน่น, กรรมวิธีที่2 เลี้ยงเชื้อบนอาหารเอียง PSA ชนิดหน้าแคบแล้วเททับด้วย mineral oil ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อโดยเทให้ท่วมผิวหน้าอาหาร PSA 1-1.5 ซม (นับจากผิวเอียงข้างบน) กรรมวิธีที่3 เก็บโดยวิธี freeze dry โดยละลายเชื้อทั้งหลอดด้วย skim milk 3 มล แล้วแบ่งใส่ในหลอด ampule ขนาด 0.5 ซม ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วทำแห้งแข็งด้วยเครื่อง lyophilizer ปิดผนึกสูญญากาศหลอด ampule ด้วยเปลวไฟจากแก๊ส แล้วเก็บทั้ง 3 กรรมวิธีดังกล่าวไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°, 10°-14° และ 30° ซ จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมาตรวจหาความมีชีวิตของเชื้อทุก ๆ 1 เดือน โดยการถ่ายเชื้อลงบนอาหาร PSA เชื้อละ 2 จาน เก็บที่ 28°ซ 2-5 วัน ถ้าหากเชื้อดังกล่าวยังมีชีวิตอยู่จะปรากฏโคโลนีของเชื้อนั้นบนอาหาร PSA ทำการตรวจหาความมีชีวิตของเชื้อในการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 ปี

เวลาและสถานที่ ต.ค. 2543 ถึง ก.ย. 2546

กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ *R. solanacearum* และทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรค

จากตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่พบในประเทศไทย ถูกนำมาแยกเชื้อสาเหตุโรคบนอาหาร TTC เก็บโคโลนีเดี่ยวโดยคัดเลือกจากโคโลนีที่มีลักษณะจำเพาะของเชื้อ *R. solanacearum* คือมีลักษณะรีหรือค่อนข้างกลม สีขาวคล้ายน้ำนม เยิ้ม นูน เป็นเมือกมันและมีตะกอนสีชมพูสะสมอยู่ตรงส่วนกลางของโคโลนี นำเชื้อที่แยกได้มาทดสอ บปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันของยาสูบ พบว่าผลการทดสอบเป็นบวกทุกไอโซเลทกล่าวคือทุกเชื้อที่ใช้ทดสอบสามารถทำให้เกิดรอยแผลไหม้สีน้ำตาลบนใบยาสูบ ยกเว้นเชื้อที่แยกได้จากยาสูบซึ่งให้ผลการทด สอบปฏิกิริยาการตอบสนองอย่างเฉียบพลันเป็นลบและผลการปลูกเชื้อเพื่อยืนยันเชื่อสาเหตุโรคพืชซึ่งเชื้อที่ใช้ทดลองทุกไอโซเลทพบว่าสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชเดิมหรือพืชอาศัยอื่นๆได้แล้วจึงนำพืชทดสอบที่เป็นโรคมาแยกเชื้อกลับตามวิธีการเดียวกับการแยกเชื้อเดิมได้เชื้อบริสุทธิ์ของ *R. solanacearum* จำนวน 115 ไอโซเลท ที่พบในพืชเศรษฐกิจ 17 ชนิดและวัชพืช 1 ชนิดได้แก่ หน้าวัว anthurium (*Anthurium andraeanum*), กระเพรา holy basil (*Ocimum sanctum*), พริกขี้หนู chili (*Capsicum mimimum*), ปทุมมา curcuma (*Curcuma alimatiforia*), มะเขือยาว eggplant (*Solanum melongena*), ยูคาลิปตัส eucalyptus (*Eucalyptus globutus*), ขิง ginger (*Ziniber officinale*), ถั่วลิสง groundnut (*Arachis hypogaea*), ดาวเรือง merigold (*African marigold*), พริกชี้ฟ้า pepper (*Capsicum annuum var. acuminatum*), พริกเหลือง pepper yellow (*Capsicum nigrum*), มันฝรั่ง potato (*Solanum tuberosum*), งา sesame (*Sesamum indicum*), ยาสูบ tobacco (*Nicotiana tabacum*), มะเขือเทศ tomato (*Lycopersicon esculentum*), มะเขือเปราะ tomato proa (*Lycopersicon annuum var. grossum*), ผักบุ้ง water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) and วัชพืชหญ้ายาง maxican fireplant (*Euphorbia geniculata*) (ตารางที่1)

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่นๆ เพื่อจำแนกชนิด race

จากการปลูกเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในพืช 18 ชนิดดังกล่าวกับพืชอาศัย 7 ชนิดได้แก่ มะเขือเทศ ยาสูบ พริก ถั่วลิสง มะเขือยาว ขิง และมันฝรั่ง พบว่าเชื้อที่ทดลองทั้งหมดสามารถจำแนกชนิดของ race เป็น race 1 ได้แก่ หน้าวัว 4 ไอโซเลท, กระเพรา 1 ไอโซเลท, พริกขี้หนู 4 ไอโซเลท, ปทุมมา 6 ไอโซเลท, มะเขือยาว 6 ไอโซเลท, ยูคาลิปตัส 1 ไอโซเลท, ขิง 10 ไอโซเลท, ถั่วลิสง 7 ไอโซเลท, ดาวเรือง 4 ไอโซเลท, พริกเหลือง 2 ไอโซเลท, พริกชี้ฟ้า 9 ไอโซเลท, มันฝรั่ง 28 ไอโซเลท, งา 2 ไอโซเลท, ยาสูบ 6 ไอโซเลท, มะเขือเทศ 6 ไอโซเลท, มะเขือเปราะ 7 ไอโซเลท, ผักบุ้ง 2 ไอโซเลท และวัชพืชหญ้ายาง 3 ไอโซเลท ยกเว้นพริกขี้หนู 1 ไอโซเลท, พริกชี้ฟ้า 1 ไอโซเลทและมันฝรั่ง 7 ไอโซเลท พบว่าเป็น race 3 (ตารางที่1)

การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิด biovar

จากการทดสอบปฏิกิริยาการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่าง ๆ สามารถจำแนกชนิดของ biovarได้ดังนี้ หน้าวัว 4 ไอโซเลท เป็น biovar3, กระเพรา 1 ไอโซเลท เป็น biovar3, พริกขี้หนู 4 ไอโซเลท เป็น biovar3 และ 1 ไอโซเลท เป็น biovar2, ปทุมมา 2 ไอโซเลท เป็น biovar3 และ 4 ไอโซเลท เป็น biovar4, มะเขือยาว 5 ไอโซเลท เป็น biovar4, ยูคาลิปตัส 1 ไอโซเลท เป็น biovar3, ขิง 4 ไอโซเลท เป็น biovar3 และ 6 ไอโซเลทเป็น biovar4, ถั่วลิสง 1 ไอโซเลท เป็น biovar3 และ 6 ไอโซเลทเป็นbiovar4, ดาวเรือง 4 ไอโซเลท เป็น biovar3 และ 1 ไอโซเลทเป็น biovar4, พริกเหลือง 2 ไอโซเลท เป็น biovar3, พริกชี้ฟ้า 2 ไอโซเลท เป็น biovar3, 7 ไอโซเลทเป็น biovar 4 และ 1 ไอโซเลท เป็น biovar2, มันฝรั่ง 7 ไอโซเลท เป็น biovar2, 3 ไอโซเลทเป็น biovar3 และ 24 ไอโซเลท เป็น biovar 4, งา 2 ไอโซเลท เป็น biovar3, ยาสูบ 5 ไอโซเลท เป็น biovar3, มะเขือเทศ 6 ไอโซเลท เป็น biovar3, มะเขือเปราะ 3 ไอโซเลท เป็น biovar3 และ 4 ไอโซเลทเป็น biovar4, ผักบุ้ง 2 ไอโซเลท เป็นbiovar4 และ วัชพืชหญ้ายาง 3 ไอโซเลท เป็น biovar3 (ตารางที่1, 2 และ 3)

ในการศึกษาการจำแนกชนิด race ผลการทดลองความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่น ๆ พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* จากพืชชนิดหนึ่งสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชอื่นๆได้ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อนี้จากพืชหนึ่งสามารถไปสู่อีกพืชหนึ่งได้ตามชนิดของพืชที่เกษตรกรปลูกในแปลงเดียวกัน (internal-crop)หรือปลูกต่อกันระหว่างปี (crop rotation) ซึ่งเชื้อนี้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในดินหรือในพืชอาศัยได้ทำให้การกระจายตัวของเชื้อจากพืชหนึ่งไปสู่อีกพืชหนึ่งมีโอกาศเกิดขึ้นได้ง่ายมาก
เช่น race 1 ที่พบในพืชต่าง ๆ เช่น ถั่วลิสง , ขิง, ปทุมมา มันฝรั่ง, พริกชี้ฟ้า, มะเขือยาวและอื่น ๆ เป็นต้น สาเหตุที่พบ race นี้เป็นส่วนมากในประเทศไทยน่าจะเกิดจากการถ่ายเชื้อจากพืชหนึ่งไปสู่อีกพืชหนึ่งเพราะเชื้อในกลุ่มนี้เป็น race 1 ซึ่งมีพืชอาศัยเป็นร้อยชนิด ส่วน race3 ที่พบในพริกซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อนก็น่าจะมาจากมันฝรั่งซึ่งมีรายงานว่าพบ race นี้ในมันฝรั่งตั้งแต่ปี 2537 ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศมาเพาะปลูกในประเทศไทยและยังมีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเป็นจำนวนมากตลอดมาในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา แต่จากการผลการทดลองนี้พบว่า race3 ที่พบ ในประเทศไทยสามารถทำให้เกิดโรคในระดับที่ไม่รุนแรงกับมันฝรั่ง มะเขือ พริกและไม่ทำให้เกิดโรคกับถั่วลิสงและขิง เป็นต้น

การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum*

ผลการตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยต่าง ๆ 17 ชนิด ด้วย แอนติซีรัมของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่ง ทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าแอนติซีรัมจากมันฝรั่งสามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific reaction) ระดับสูง (strong reaction) ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคนี้กับมะเขือเทศ มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริกขี้หนู พริกเหลือง พริกชี้ฟ้า ยาสูบ งาและผักบุ้ง สามารถอ่านค่า OD ของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ELISA reader ได้ > 1.5, เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับกลาง (moderate reaction) ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืช หน้าวัว กระเพรา ปทุมมา ขิง ถั่วลิสงและ ดาวเรือง สามารถอ่านค่าของ

1 การจำแนกชนิด race และ biovar ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

ะ	ระดับที่	จังหวัด	ปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อบริสุทธิ์	ความสามารถในการทำให้เกิดโรค							race ชนิด	คุณสมบัติทางชีวเคมี		biovar ชนิด
				มะเขือเทศ	ยาสูบ	พริก	ขิง	กั๋วลิสง	มะเขือยาว	มันสำปะหลัง		hexose alcohol	di saccharide	
	150	เชียงใหม่	+	5	0	3	nd	1	3	5	1	+	+	3
	151	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	1	5	2	1	+	+	3
	157	เชียงราย	+	5	0	5	nd	2	5	2	1	+	+	3
	169	ลำปาง	+	5	0	5	nd	1	5	5	1	+	+	3
	158	กาญจนบุรี	+	5	0	5	nd	2	5	3	1	+	+	3
	8	เชียงใหม่	+	6	0	5	nd	1	5	3	1	+	+	3
ล	23	กำแพงเพชร	+	5	0	5	nd	5	5	5	1	+	+	3
	28	เชียงราย	+	2	0	2	nd	1	2	2	3	-	+	2
	106	เชียงใหม่	+	5	0	nd	nd	1	nd	nd	1	+	+	3
	107	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	1	5	1	1	+	+	3
า	25*	เชียงใหม่	+	1	0	0	1	1	1	1	1	+	-	4
	112	เชย	+	3	0	0	5	2	5	3	1	+	-	4
	144	กาญจนบุรี	+	5	0	2	5	3	2	1	1	+	-	4
	146	เชียงใหม่	+	5	0	2	5	2	2	3	1	+	+	3
	147	เชียงใหม่	+	1	0	2	5	3	2	1	1	+	-	4
	170	เชียงใหม่	+	2	0	2	5	2	5	3	1	+	+	3
เรียยาว	9	ลำปาง	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5	nd	nd	nd	nd	nd
	10	แพร่	+	5	0	5	nd	2	5	3	1	+	-	4
	19	กำแพงเพชร	+	5	0	5	nd	2	5	5	1	+	-	4
	90	เชียงใหม่	+	4	0	5	nd	2	5	5	1	+	-	4
	113	เลย	+	4	0	4	nd	1	5	5	1	+	-	4
	115	ขอนแก่น	+	4	0	4	nd	1	5	5	1	+	-	4
	164	เชียงใหม่	+	5	0	4	nd	2	5	3	1	+	-	4
มูลาสิปลัส	116	กาญจนบุรี	+	5	0	5	nd	5	5	3	1	+	+	3
ขิง	11	ลำปาง	+	5	0	2	3	3	5	2	1	+	+	3
	70	กาญจนบุรี	+	5	0	4	3	2	5	2	1	+	-	4
	74	เชียงราย	+	1	0	2	3	2	3	2	1	+	-	4
	89	เชียงใหม่	+	5	0	5	5	3	5	5	1	+	+	3
	91	เชียงใหม่	+	5	0	2	5	2	5	2	1	+	+	3
	135	เชียงราย	+	5	0	4	3	2	5	5	1	+	+	4
	145	กาญจนบุรี	+	3	0	2	3	2	3	4	1	+	-	4
	162	เชียงราย	+	1	0	1	5	3	5	2	1	+	-	4
	163	เชียงราย	+	2	nd	4	5	1	5	2	1	+	-	4
	172	เชียงราย	+	3	0	2	4	3	5	3	1	+	-	4

Scanned by CamScanner

ตารางที่ การจำแนกชนิด race และ biovar ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ลำดับที่	ระดับดี	จังหวัด	ปฏิกิริยาตอบสนองต่อน้ำเชื้อมาตรฐาน	ความสามารถในการทำให้เกิดโรค							race	คุณสมบัติทางชีวเคมี		biovar
				มะเขือเทศ	ยาสูบ	พริก	ขิง	ถั่วลิสง	มะเขือยาว	มันสำปะหลัง	ชนิด	hexose alcohol	di saccharide	ชนิด
	16	สุโขทัย	+	5	0	2	2	5	5	5	1	+	-	4
	75*	กาญจนบุรี	+	2	0	0	1	1	2	1	1	+	-	4
	80	นครสวรรค์	+	1	0	2	1	3	2	5	1	+	+	3
	110	อุบลราชธานี	+	5	0	2	1	5	5	5	1	+	-	4
	111	ร้อยเอ็ด	+	3	nd	nd	nd	4	nd	3	1	nd	nd	nd
	119	เชียงใหม่	+	5	0	2	2	4	5	2	1	+	-	4
	120	เชียงใหม่	+	5	0	3	2	5	5	5	1	+	-	4
	167	เชียงใหม่	+	5	0	2	2	5	5	2	1	+	-	4
	45	พิษณุโลก	+	5	0	5	nd	4	5	5	1	+	+	3
	137	นนทบุรี	+	5	0	5	nd	1	5	1	1	+	+	3
	149	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	2	5	5	1	+	+	3
	156	เชียงราย	+	5	0	5	nd	1	5	5	1	+	+	3
	81	กาญจนบุรี	+	3	0	5	nd	1	2	3	1	+	+	3
	86	เชียงใหม่	+	4	0	5	nd	2	5	4	1	+	+	3
	1	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	3	5	5	1	+	+	3
	22	กำแพงเพชร	+	5	0	5	nd	3	5	5	1	+	+	3
	28	ตาก	+	nd	0	5	nd	2	2	5	1	+	-	4
	44	พิษณุโลก	+	5	0	3	nd	4	5	5	1	+	-	4
	64	กาญจนบุรี	+	4	0	3	nd	1	5	5	1	+	-	4
	69	กาญจนบุรี	+	2	0	2	nd	2	2	2	3	-	+	2
	85	เชียงใหม่	+	4	0	3	nd	2	5	5	1	+	-	4
	132	เชียงราย	+	5	0	5	nd	5	5	5	1	+	-	4
	143	กาญจนบุรี	+	3	0	5	nd	5	5	5	1	+	-	4
	155	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	3	5	5	1	+	-	4
	12	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	5	5	5	1	+	-	4
	18	ตาก	+	2	0	2	nd	2	2	2	3	-	+	2
	41	เชียงใหม่	+	nd	0	2	nd	1	5	3	1	+	-	4
	42	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	2	5	5	1	+	-	4
	47	ตาก	+	5	0	3	nd	5	5	5	1	+	-	4
	48	เชียงราย	+	5	0	1	nd	3	5	5	1	+	-	4
	51	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	5	5	5	1	+	-	4
	53	เชียงใหม่	+	2	0	1	nd	2	4	5	1	+	-	4
	54	เลย	+	5	0	1	nd	2	5	5	1	+	-	4
	57	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	3	5	3	1	+	-	4
	58	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	2	4	5	1	+	-	4
	59	เชียงใหม่	+	5	0	4	nd	2	5	5	1	+	-	4
	61	เชียงราย	+	5	0	2	nd	2	5	5	1	+	-	4
	62*	เชียงราย	+	0	0	1	nd	0	0	1	1	+	+	4
	63	เชียงราย	+	5	1	1	nd	2	3	5	1	+	+	4

Scanned by CamScanner

งที่1 การจำแนกชนิด race และ biovar ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ภาคัย	ระลัดที่	จังหวัด	ปฏิกิริยาตอบสนองของเลียนหลัน	ความสามารถในการทำให้เกิดโรค							race ชนิด	คุณสมบัติทางชีวเคมี		biovar ชนิด
				มะเขือเทศ	ยาสูบ	พริก	ขิง	ถั่วลิสง	มะเขือยาว	มันฝรั่ง		hexose alcohol	disaccharide	
	66	เพชรบูรณ์	+	5	0	4	nd	5	5	5	1	+	-	4
	67	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	2	5	5	1	+	-	4
	68	เชียงใหม่	+	5	0	3	nd	2	5	2	1	+	+	4
	72	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	1	5	5	1	+	-	3
	73	เชียงใหม่	+	5	0	1	nd	2	3	5	1	+	-	4
	76	เชียงใหม่	+	4	0	5	nd	1	5	5	1	+	-	4
	77	เชียงใหม่	+	2	0	0	nd	1	2	2	3	-	+	4
	78	เชียงใหม่	+	2	0	0	nd	2	2	2	3	-	+	2
	82	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	1	5	5	1	+	-	2
	83	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	2	5	5	1	+	-	4
	87	เชียงใหม่	+	nd	0	4	nd	2	5	2	1	+	-	4
	94	เชียงใหม่	+	nd	0	1	nd	2	2	2	3	-	+	4
	95*	เชียงใหม่	+	1	0	1	nd	1	0	0	1	+	-	2
	97	เชียงใหม่	+	5	0	1	nd	1	5	5	1	nd	nd	4
	99	เชียงใหม่	+	nd	0	1	nd	1	2	2	3	-	+	nd
	100	เชียงใหม่	+	2	0	1	nd	1	2	2	3	-	+	2
	103	เชียงใหม่	+	2	0	1	nd	1	2	2	3	-	+	2
	108*	เลย	+	1	0	1	nd	0	0	1	1	+	+	2
	117	เชียงใหม่	+	5	0	4	nd	2	5	5	1	+	-	3
	118	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	3	5	5	1	+	-	4
ขา	109	ชุมพรราชานี	+	5	0	4	nd	2	5	4	1	+	+	4
	171	กรุงเทพฯ	+	4	0	5	nd	1	3	2	1	+	+	3
ยาสูบ	13	แพร่	-	5	3	5	nd	2	5	5	1	+	+	3
	14	แพร่	-	5	3	5	nd	2	3	3	1	+	+	3
	15	น่าน	-	5	4	4	nd	2	5	5	1	+	+	3
	21	ลำปาง	-	5	3	5	nd	1	5	3	1	+	+	3
	139	กาญจนบุรี	-	3	4	5	nd	1	5	5	1	nd	nd	nd
	140	กาญจนบุรี	-	5	3	5	nd	1	5	2	1	+	+	3
มะเขือเทศ	114	ขอนแก่น	+	5	0	5	nd	3	5	5	1	+	+	3
	133	เชียงราย	+	5	0	4	nd	2	5	5	1	+	+	3
	134	เชียงราย	+	nd	0	5	nd	1	5	5	1	+	+	3
	138	กาญจนบุรี	+	5	0	5	nd	1	5	5	1	+	+	3
	148	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	2	5	1	1	+	+	3
	160	ราชบุรี	+	5	0	5	nd	2	5	1	1	+	+	3

Scanned by CamScanner

ตารางที่1 การจำแนกชนิด race และ biovar ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย (ต่อ)

ที่อ้างอิง	ระดับที่	จังหวัด	ปฏิกิริยาตอบสนองอย่างเฉียบพลัน	ความสามารถในการทำให้เกิดโรค							race	คุณสมบัติทางชีวะเคมี		biovar
				มะเขือเทศ	ยาสูบ	พริก	ขิง	ขิงสด	มะเขือยาว	มันฝรั่ง	ชนิด	hexose alcohol	di saccharide	ชนิด
...ประ	7	เชียงใหม่	+	5	0	5	nd	5	5	2	1	+	+	3
	92	เชียงใหม่	+	2	0	4	nd	2	5	1	1			4
	141	กาญจนบุรี(W)	+	3	0	4	nd	2	5	1	1	+	+	3
	159	ราชบุรี(M)	+	4	0	3	nd	2	5	1	1	+	-	4
	161	ลำปาง	+	nd	nd	nd	nd	nd	4	nd	nd	nd	nd	nd
	165	ตาก	+	5	0	3	nd	4	5	2	1	+	-	4
	166	แม่ฮ่องสอน	+	5	0	4	nd	5	5	2	1	+	-	4
	168	กำแพงเพชร	+	5	0	4	nd	2	5	3	1	+	+	3
...ผู้	50	พิจิตร	+	2	0	5	nd	3	5	5	1	+	-	4
	55	นนทบุรี	+	5	0	5	nd	3	5	5	1	+	-	4
...ดเขียวหญ้าขาว	142	กาญจนบุรี	+	5	0	3	nd	2	5	4	1	+	+	3
	153	เชียงใหม่	+	5	0	2	nd	1	5	1	1	+	+	3
	154	เชียงใหม่	+	5	3	4	nd	3	5	5	1	+	+	3

+ = mutant strain, nc = แสดงจุด (necrotic lesion), nd = ไม่ได้ทดสอบ (not determine)

+ = ปฏิกิริยาบวก มีการสร้างกรด

- = ปฏิกิริยาลบ ไม่มีการสร้างกรด

ปฏิกิริยาการเกิดโรค (Disease reaction)

0 = ต้นปกติ

1 = 1-2 ใบล่างแสดงอาการเหี่ยว

2 = 3-4 ใบล่างแสดงอาการเหี่ยว

3 = ครึ่งต้นแสดงอาการเหี่ยว

4 = 3/4 ต้นแสดงอาการเหี่ยว

5 = เหี่ยวทั้งต้น

Scanned by CamScanner

ตารางที่2 ชนิดและร้อยละของ biovar ของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่พบในประเทศไทย

พืชอาศัย	จำนวนเชื้อ (ไอโซเลท)	ชนิด biovar							
		1		2		3		4	
		จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
หน้าวัว	4	-	-	-	-	4	100	-	-
กระเพรา	1	-	-	-	-	1	100	-	-
พริกขี้หนู	5	-	-	1	20	4	80	-	-
ปทุมมา	6	-	-	-	-	2	33	4	67
มะเขือยาว	6	-	-	-	-	-	-	6	100
ยูคาลิปตัส	1	-	-	-	-	1	100	-	-
ขิง	10	-	-	-	-	4	40	6	60
ถั่วลิสง	7	-	-	-	-	1	13	6	87
ดาวเรือง	4	-	-	-	-	4	100	-	-
พริกเหลือง	2	-	-	-	-	2	100	-	-
พริกขี้ฟ้า	10	-	-	1	10	2	20	7	70
มันฝรั่ง	34	-	-	7	20	3	9	24	71
งา	2	-	-	-	-	2	100	-	-
ยาสูบ	5	-	-	-	-	5	100	-	-
มะเขือเทศ	6	-	-	-	-	6	100	-	-
มะเขือเปราะ	7	-	-	-	-	3	43	4	57
ผักบุ้ง	2	-	-	-	-	-	-	2	100
วัชพืชหญ้ายาง	3	-	-	-	-	3	100	-	-
รวม	115			9	8	47	41	59	51

Scanned by CamScanner

ตารางที่3 การจำแนกชนิดเชื้อ *Ralstonia solanacearum* biovar 2 ที่พบในประเทศไทย

พืชอาศัย	หมายเลขเชื้อ	Biochemical reaction				Biovar 2 type	
		Ribose	Trehalose	Tryptophane	Tartaric acid	A	T
พริกขี้หนู	29	-	-	-	-	*	
พริกขี้ฟ้า	69	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	18	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	77	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	78	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	94	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	99	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	100	-	-	-	-	*	
มันฝรั่ง	103	-	-	-	-	*	

- = ปฏิกิริยาเป็นลบ ไม่มีการสร้างกรด (negative reaction of acid fromation)

* = ทุก biovar 2 ที่นำมาทดสอบพบว่าเป็นชนิด A type)

Scanned by CamScanner

ปฏิกิริยาได้ระหว่าง 0.6 - 1.5 และเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับอ่อน (weak reaction) กับเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชยูคาลิปตัสและวัชพืชหญ้ายาง สามารถอ่านค่า OD ของปฏิกิริยาได้< 0.6 และไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อที่ใช้เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ (negative reaction) ได้แก่ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ, carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer, BSA และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้แก่ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefacian, และ Xanthomonas camprestis* pv.*incoanae*

ตารางที่4 ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของแอนติซีรัมจากเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในมันฝรั่งกับเชื้อนี้ในพืชอาศัยอื่น ๆ

เชื้อ *R. solanacearum* ของพืชอาศัย	ค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา(OD)
กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวก	++++
หน้าวัว (Anthurium)	++
กระเพรา (Basil Pepper)	++
พริกขี้หนู (Chili)	+++
ปทุมมา (Curcuma)	++
มะเขือยาว (Eggplant)	+++
ยูคาลิปตัส(Eucalyptus)	+
ขิง (Ginger)	++
ถั่วลิสง (Groundnut)	++
ดาวเรือง (Merigold)	++
พริกเหลือง (Pepper-yellow)	+++
พริกขี้ฟ้า(Pepper-chilli)	+++
งา (Sesame)	+++
ยาสูบ (Tobacco)	+++
มะเขือเทศ (Tomato)	+++
มะเขือเปราะ (Tomato-proa)	+++
ผักบุ้ง (Water convolvulus)	+++
วัชพืชหญ้ายาง (Maxican fireplant)	+
กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ	-
เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ	-

+ = ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระดับอ่อน (OD < 0.6), ++ = ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระดับกลาง (OD = 0.6 - 1.5), +++ = ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระดับสูง (OD > 1.5), กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวก = เชื้อ *R. solanacearum* ที่เป็น homologous (primary) immunogen, กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ = น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ, carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer และ BSA, เชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ = *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefacian* และ *Xanthomonas camprestis* pv.*incoanae*

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum*

ผลการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชอาศัย 5 ชนิดครอบคลุม 2 ชนิด race และ 3 ชนิด biovar ด้วยวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บใต้ mineral oil และการเก็บแบบ freeze dry ที่อุณหภูมิ 4° ซ, 10°-14° ซ และ 30° ซ นำมาตรวจหาความมีชีวิตของเชื้อ (viability) บนอาหาร PSA ภายในระยะเวลา 3 ปี พบว่าความมีชีวิตของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชชนิดต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันในแต่ละพืชอาศัย ชนิด race และ ชนิด biovar ของแต่ละกรรมวิธีในการเก็บรักษาโดยเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกไอโซเลทสามารถมีชีวิตอยู่ได้มากกว่า 3 ปี ยกเว้นใน กรรมวิธีการเก็บใต้ mineral oil ที่ 30° ซ พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* race 3 biovar 2 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 17 เดือน, race 1 biovar 4 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 23 เดือน และrace 1 biovar 3 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 27 เดือน ดังนั้นผลที่ได้จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าการเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 30° ซ ในระยะเวลา 3 ปี เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวที่สะดวกและประหยัดที่สุด

ตารางที่5 ความมีชีวิตของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากการเก็บรักษาด้วยวิธี mineral oil ที่ 30^0 ซ

Ralstonia solanacearum	ความมีชีวิตของเชื้อ ระยะเวลาในการเก็บรักษาเชื้อ (เดือน)										
	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	36
มันฝรั่ง race 1 biovar 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
มันฝรั่ง race 1 biovar 4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
มันฝรั่ง race 3 biovar 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
พริก race 1 biovar 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
มะเขือเทศrace1biovar3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
ปทุมมา race 1 biovar 4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
ขิง race 1 biovar 4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+ = เชื้อ *Ralstonia solanacearum* มีชีวิต, - = เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ไม่มีชีวิต

ตารางที่6 ทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในเวลา 3 ปี

Ralstonia solanacearum	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (^{0}ซ)			mineral oil (^{0}ซ)			freeze dry (^{0}ซ)		
	4	10-14	30	4	10-14	30	4	10-14	30
มันฝรั่ง race 1 biovar 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+
มันฝรั่ง race 1 biovar 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+
มันฝรั่ง race 3 biovar 2	+	+	+	+	+	-	+	+	+
พริก race 1 biovar 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+
มะเขือเทศrace1biovar 3	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ปทุมมา race 1 biovar 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ขิง race 1 biovar 4	+	+	+	+	+	-	+	+	+

+ = เชื้อ *Ralstonia solanacearum* มีชีวิต, - = เชื้อ *Ralstonia solanacearum* ไม่มีชีวิต

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จำนวน 115 ไอโซเลท ที่แยกจากตัวอย่างโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจ 17 ชนิด และวัชพืช 1 ชนิด จาก 21 จังหวัดของประเทศไทย หลังจากทดสอบ เพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคแล้วนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีเพื่อหาชนิดของ biovar และทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยอื่น ๆ เพื่อหาชนิดของ race พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จาก หน้าวัว 4 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, กระเพรา 1 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, พริกขี้หนู 4 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 1 ไอโซเลท เป็น race 3 biovar 2A, ปทุมมา 2 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 4 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, มะเขือยาว 7 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, ยูคาลิบตัส 1 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, ขิง 4 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 6 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, ถั่วลิสง 1 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 6 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, ดาวเรือง 4 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, พริกเหลือง 2 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, พริกชี้ฟ้า 1 ไอโซเลทเป็น race 3 biovar 2A, 2 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 7 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, มันฝรั่ง 7 ไอโซเลท เป็น race 3 biovar 2A, 3 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 24 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, งา 2 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, ยาสูบ 5 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, มะเขือเทศ 6 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3, มะเขือเปราะ

3 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3 และ 4 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4, ผักบุ้ง 2 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 4 และวัชพืชหญ้ายาง 3 ไอโซเลท เป็น race 1 biovar 3. ซึ่งข้อมูลชนิด biovar และ ชนิด race เหล่านี้เป็นข้อมูลพื้นฐานของเชื้อที่เป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับอาจารย์, นักวิชาการ, นักวิจัย, นิสิต, นักศึกษาและผู้สนใจในการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวข้องกับโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่กำลังเป็นปัญหาที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดในประเทศไทย

จากการทดสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่งเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อดังกล่าวที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอื่น ๆ ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าแอนติซีรัมจากมันฝรั่งสามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะ (specific reaction) ระดับสูง (strong reaction) ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคนี้กับมะเขือเทศ มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริกขี้หนู พริกเหลือง พริกชี้ฟ้า ยาสูบ งาและผักบุ้ง เกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับกลาง (moderate reaction) ต่อเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืช หน้าวัว กระเพรา ปทุมมา ขิง ถั่วลิสงและ ดาวเรือง และเกิดปฏิกิริยาจำเพาะระดับอ่อน (weak reaction) กับเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชยูคาลิปตัสและวัชพืชหญ้ายาง และไม่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อที่ใช้เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ (negative reaction) ผลการทดลองทำให้ทราบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้จากเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคกับมันฝรั่งสามารถนำไปปรับใช้กับเชื้อ *R. solanacearum* ที่ทำให้เกิดโรคเหี่ยวกับ มะเขือเทศ มะเขือยาว มะเขือเปราะ พริกขี้หนู พริกเหลือง พริกชี้ฟ้า ยาสูบ งาและผักบุ้ง ในงานวิจัยต่าง ๆ ได้โดยเฉพาะงานวิจัยทางการตรวจหาเชื้อ (detection) เช่น การนำชุดสำเร็จตรวจสอบเชื้อ *R. solanacearum* ของมันฝรั่งไปปรับใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของ มะเขือเทศและพริกต่าง ๆ เป็นต้น

จากการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืช 5 ชนิดครอบคลุม 3 ชนิด biovar ด้วยวิธีการเก็บในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ การเก็บใต้ mineral oil และการเก็บแบบ freeze dry ที่อุณหภูมิ 4° ซ, 10°-14° ซ และ 30° ซ เมื่อนำมาตรวจหาความมีชีวิตของเชื้อ (viability) ภายในระยะเวลา 3 ปีพบว่าความมีชีวิตของเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดกับพืชชนิดต่าง ๆ ไม่แตกต่างกันในแต่ละ พืชอาศัยและแต่ละกรรมวิธีโดยเชื้อที่ใช้ทดสอบทุกไอโซเลทสามารถมีชีวิตอยู่ได้ยกเว้นในกรรมวิธีการเก็บใต้ mineral oil ที่ 30° ซ พบว่าเชื้อ *R. solanacearum* race 3 biovar 2 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 17 เดือน, race 1 biovar 4 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 23 เดือน และrace 1 biovar 3 จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 27 เดือน แสดงว่าเชื้อ biovar 3 มีความสามารถในการอยู่รอด (survival) ได้ดีกว่า biovar 4 และ biovar 2 ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการใช้น้ำตาลตามคุณสมบัติของเชื้อ biovar 3 ซึ่งมีมากกว่า biovar 2 และ 4 ในทำนองเดียวกันเชื้อ *R. solanacearum* race 1 ที่มีความสามารถในการอยู่รอดได้ดีกว่า race 3 เพราะว่า race 1 มีพืชอาศัยกว้างขวางกว่า race 3 มาก เป็นต้น นอกจากนี้ผลที่ได้จากการทดลองนี้ยังทำให้ทราบว่าการเก็บรักษาเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดแก้วฝาเกลียวที่อุณหภูมิ 30° ซ ในระยะเวลา 3 ปี เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวที่สะดวกและประหยัดที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ คุณสุเนตรา ภาวิจิตร , คุณวนิดา ฐิตะฐาน, คุณมาโนช ทองเจียม คุณกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร กรมวิชาการเกษตร , คุณนัฏตินา เนตรสุวรรณ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ , CIP (Center International of Potato), JSPS (Japan Science Promotion Society), TUA (Tokyo University of Agriculture), NIAES (National Institute for Agro-Environmental Science) ที่กรุณาให้การสนับสนุนการวิจัยนี้ด้วยดีตลอดมา.

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล 2538 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในประเทศไทย. รายงานประจำปี 2538 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. หน้า 93-105

วงศ์ บุญสืบสกุล 2538 การตรวจหาเชื้อ*Pseudomonas solanacearum* ในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ รายงานประจำปี 2538 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. หน้า 105-119

วงศ์ บุญสืบสกุล 2539 การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจหาเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในประเทศไทย. รายงานประจำปี 2539 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 16 หน้า.

Buddenhagen, I.; L. Sequeira and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52: 726.

Buddenhagen, I. 1985. Bacterial wilt revisited. Pages 126-143 *In*: Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific, G.J. Presley (ed.). ACIAR. Proc. No. 13. canberra, Australia.

Cook, D.; E. Barlow and L. Sequera.1989. DNA probes as tools for the study of host-pathogen evaluation: the example of *Pseudomonas solanacearum.* Pages 103-108 *In*: Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions, Vol.1. H. Hennecke and D.P.D Verma (eds.). Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.

Devay, J.E. and W.C. Schnathorst. 1963. Single-cell isolation and preservation of bacterial cultures. *Nature* (London). 199:755.

Dhingra, O.D. and J.B. Sinclair. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Prss. Boca Raton, Florida. 355 pp.

Graham, J.H. 1952. Preservation of three bacterial pathogens of soybean in culture. *Plant Dis. Rep.* 36:22.

Harris, D. 1972. Intra-specific variation in *Pseudomonas solanacearum*. Pages 289-292 *In*: Proc. 2nd Int. Conf. Plant Path. Bact., Wageningen, The Netherlands.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum. App. Bacteriology* 27:265 – 277.

Hayward, A.C. 1991. Biological and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* Annu. Rev. *Phytopathology* 26: 65-87.

Hayward, A.C. 1994. Symtematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pages 123-135 *In*: Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum.* A.C. Hayward and G.L. Hartman (eds.). CABI, Wallingford.

He, L.; L. Sequera. and A. Kelman. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas Solanacearum* from China. *Plant Disease*. 67: 1357-1361.

Kelman, A. 1954. The relationship and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazorium media. *Phytopathology* 44: 693-695.

Kelman, A. and L.H. Person. 1961. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenisity of tobacco and peanut. *Phytopathology* 51:158.

Martin, C. and E. R. French. 2000. Bacterial Wilt of Potato *Ralstonia solanacearum*. Center International Potato (CIP), Lima, Peru. 16 pp.

Palleroni, N. J. and M. Doudoroff. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonuecleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum. Bacteriology* 107: 690-696.

Pegg, K. and M. Moffet. 1971. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum.* In Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb*. 11: 696-698.

Proom, H. and L.M. Hemmons, 1949. The drying and preservation of bacterial cultures. *J. Gen. Microbiol.* 3:7.

Quadling, C. 1960. Preservation of *Xanthomonas* by freezing in glycerol broth. *Can. J. Microbiol.* 6:475.

Seal, S.E. and J.G. Elphinstone. 1994. Advance in Identification and Detection of *Pseudomonas solanacearum.* Pages 123-125 *In:* Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum.* A.C. Hayward and G.L. Hartman (eds.) CABI, Wallingford.

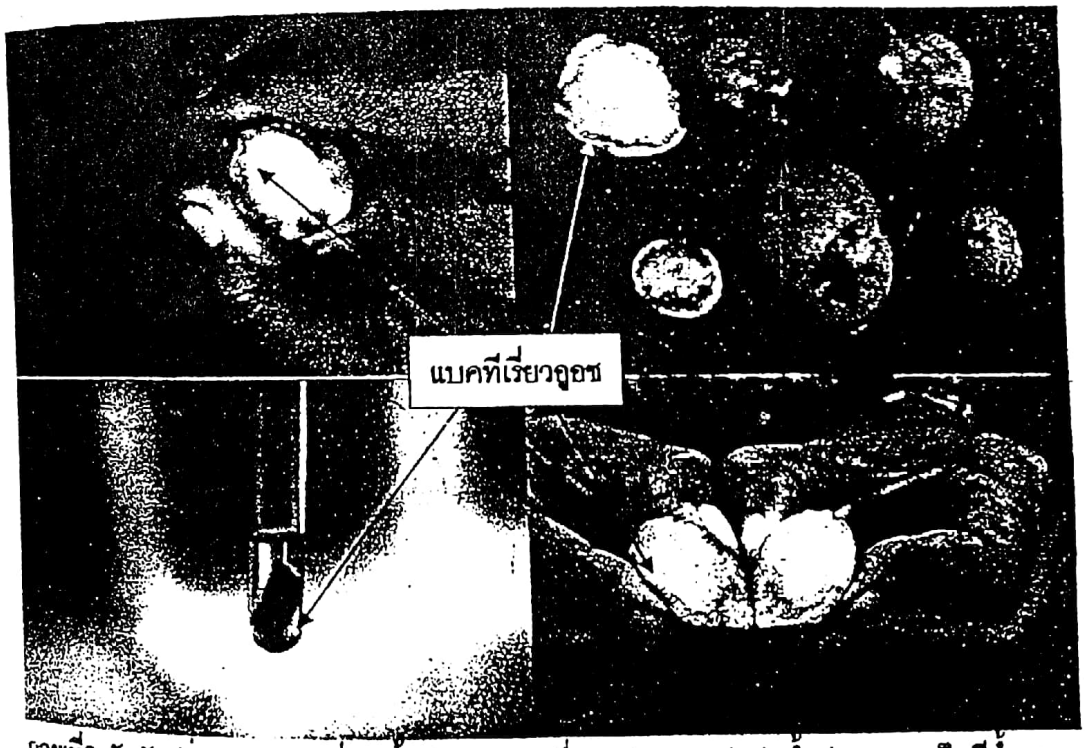
Stark, C.N. and B.I. Hemington. 1931. The drying of bacteria and the viability of dry bacterial cells. *J. Bacteriol*. 21:13.

Sleesman, J.P. and C., Leben, 1978. Preserving phytopathogenic bacteria at -70^0 C or with silica gel. *Plant Dis. Rep*. 62:910.

Yabuuchi, E.; Y. Kosako; I. Yano; H. Hotta and Y. Nishiuchi.1995.Transfer of 2 *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. Nov. *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. Microbiology Immunology. 39: 897-904.

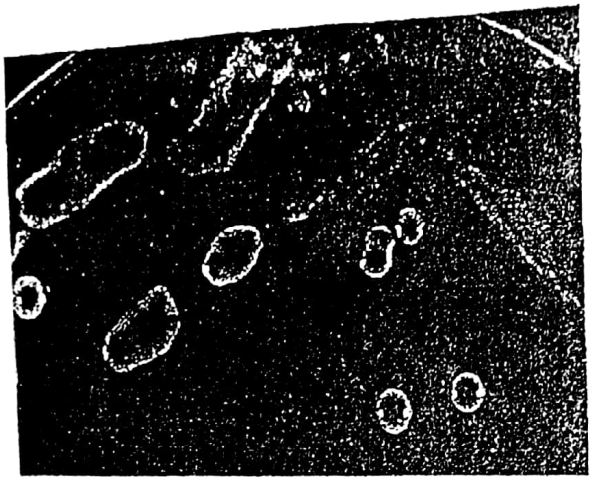
Zensen, J.H. and J.E., Livingston. 1944. Variation in symptoms produced by isolates of *Phytomonas medicaginis* var. *phaseolicola*. *Phytopathology* 34:471.

ภาพที่1 โรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ต้นพืชจะแสดงอาการเหี่ยวในขณะที่ต้นและใบพืชยังเขียวอยู่ (อายุ 20-65 วัน) ชาวบ้านจึงเรียกโรคนี้ว่า "โรคเหี่ยวเขียว". ในภาพต้นซ้ายมือคือต้นปกติส่วนต้นขวามือคือต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายและแสดงอาการโรคเหี่ยว



ภาพที่2 หัวมันฝรั่งและแง่งขิงที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเมื่อผ่าหัวจะพบว่าท่อน้ำท่ออาหารเป็นสีน้ำตาล ถ้าเป็นมาก ๆ จะมีอาการเน่าหรือปล่อยไว้สักพักแล้วบีบหัวจะพบว่ามีเชื้อแบคทีเรียสีขาวขุ่นข้นไหลออกมาเรียกว่า แบคทีเรียวอูอชหรืออูอช ถ้าตัดต้นแช่ในน้ำสะอาดทิ้งไว้สักพักก็จะเห็นอูอชไหลออกมาทางรอยตัดของท่อน้ำท่ออาหารมารวมกองอยู่ที่ก้นหลอด

Scanned by CamScanner

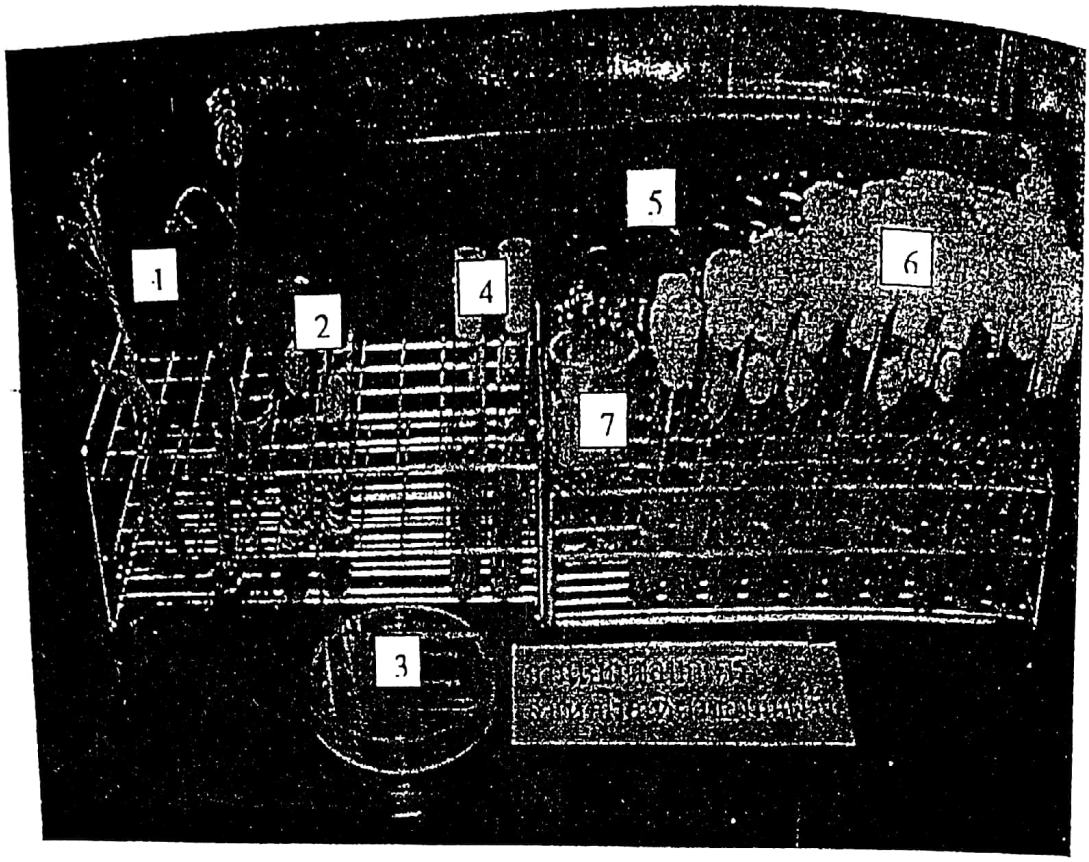


ภาพที่3 ลักษณะเฉพาะของโคโลนี ของเชื้อ *R. solanacearum* บน อาหาร TTC คือ โคโลนีมีลักษณะรี หรือค่อนข้างกลม สีขาวคล้ายน้ำนม เยิ้มเป็นเมือกมัน นูนและมีตะกอนสี ชมพูสะสมตรงกลางโคโลนี

Scanned by CamScanner

ภาพที่4 โรคเหี่ยวที่เกิดกับพืชต่าง ๆ ถั่วลิสง(1), มะเขือเทศ(2), ปทุมมา(3), พริก(4), มะเขือเปราะ (5), มะเขือยาว(6), ขิง(7), ยาสูบ(8) และงา(9) เป็นต้น

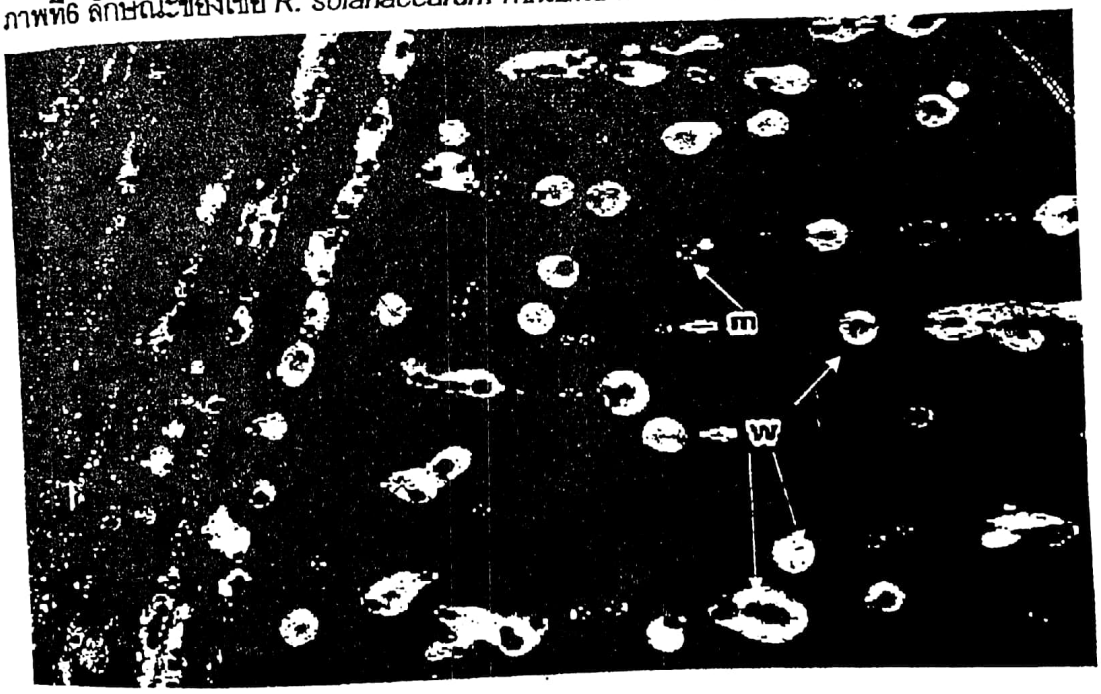
Scanned by CamScanner



ภาพที่5 การแยกเชื้อ *R. solanacearum* จากส่วนของพืชที่เป็นโรค 1=ส่วนของพืชที่เป็นโรค, 2= นำส่วนที่เป็นโรคใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ, 3=นำน้ำที่มีเชื้อมาลากบนอาหาร PSA หรือ TTC เพื่อแยกโคโลนีเดี่ยว, 4=เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวย้ายใส่อาหารเอียง PSA เมื่อเชื้อขึ้นเต็มผิวหน้าอาหาร, จึงทำการเก็บรักษาเชื้อโดย 5=ย้ายเชื้อ 2 ลูปเต็มใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดฝาเกลียว, 6= ย้ายเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเอียงหน้าแคบเมื่อเชื้อขึ้นเต็มผิวหน้าแล้วเททับด้วย mineral oil และ 7= เก็บเชื้อผสม skim milk ในแอมปูแบบ Freeze dry (รายละเอียดอยู่ในวิธีการทดลอง)

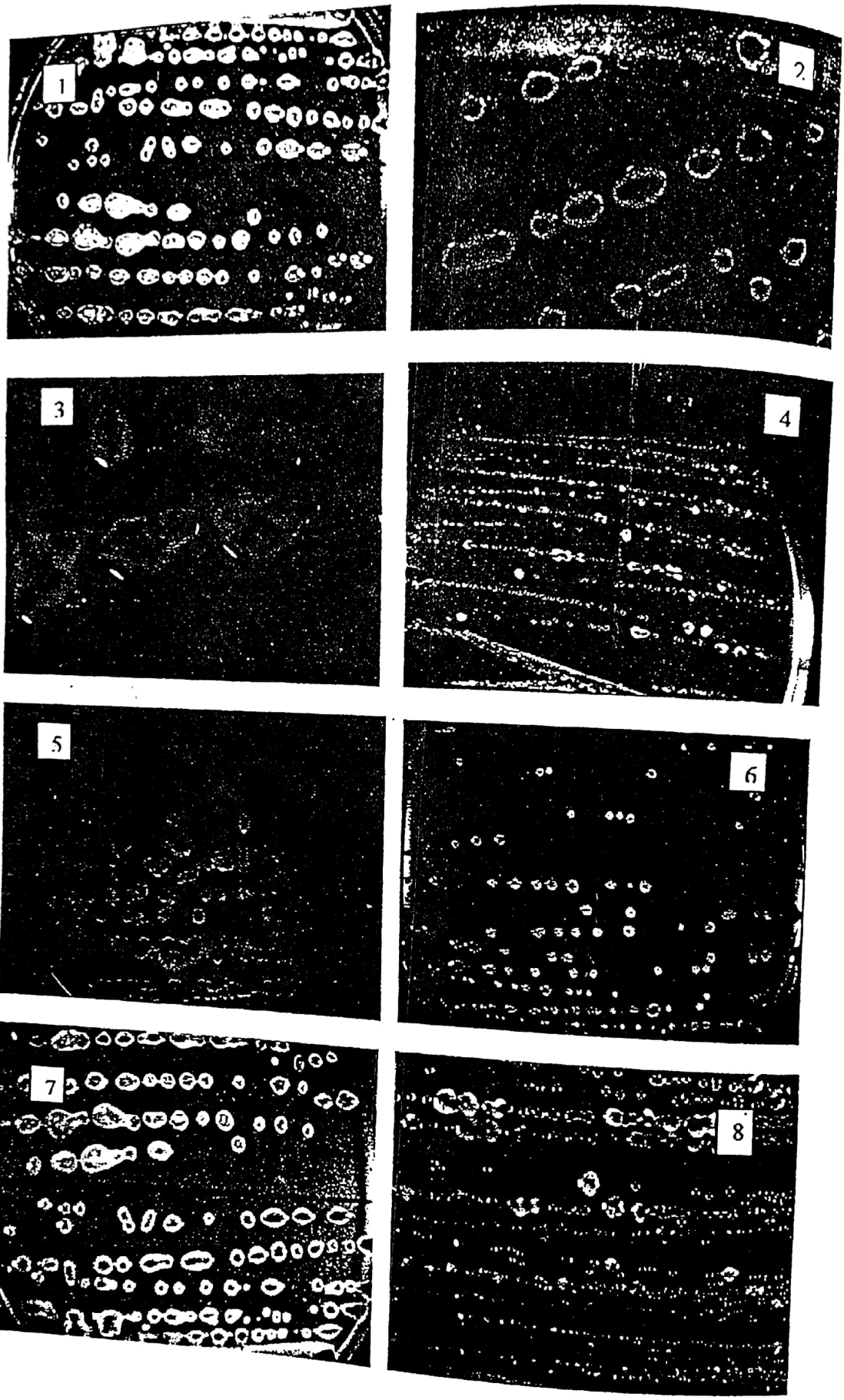
Scanned by CamScanner

ภาพที่6 ลักษณะของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ขึ้นบนอาหาร PSA

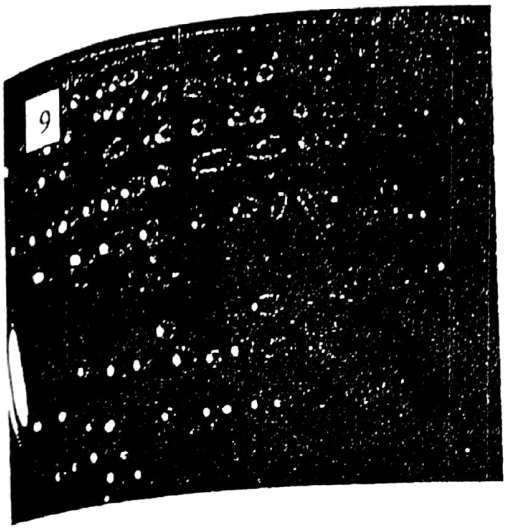


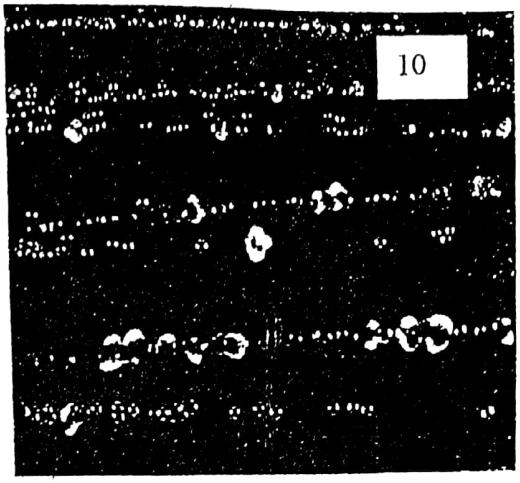
ภาพที่7 ลักษณะของเชื้อ *R. solanacearum* ที่ขึ้นบนอาหาร TTC W=Wild type ที่เป็น virulent strain โคโลนีรีหรือค่อนข้างกลม สีขาวคล้ายน้ำนม เยิ้มเป็นเมือกมัน นูนและมีตะกอนสีชมพูสะสมตรงกลางโคโลนี m=mutant strain เป็นเชื้อ *R. solanacearum* ที่สูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค (avirulent strain) โคโลนีค่อนข้างกลม นูนเล็กน้อย ไม่เป็นเมือก ไม่เยิ้ม มีตะกอนสีชมพูกระจายเกือบเต็มโคโลนี

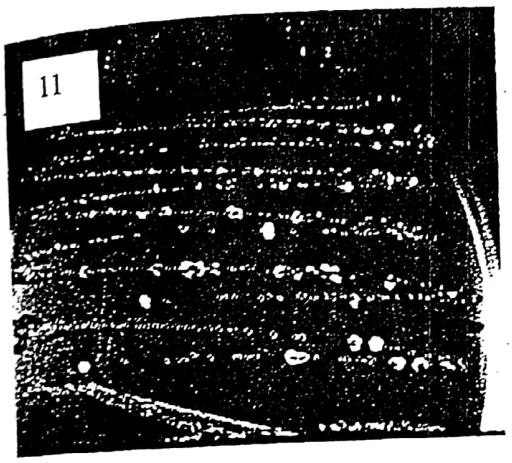
Scanned by CamScanner

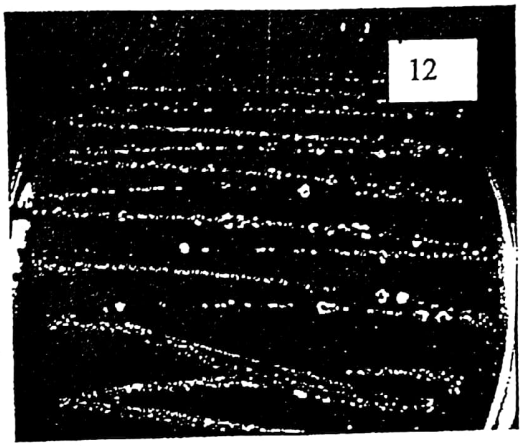


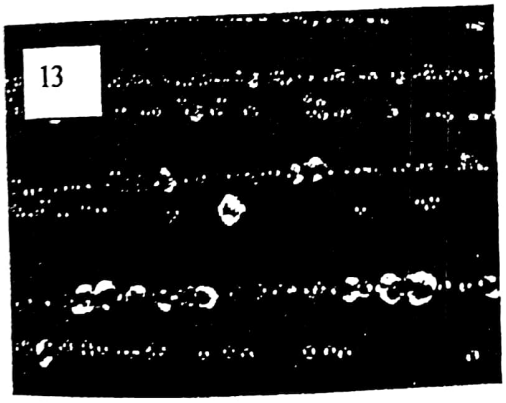
Scanned by CamScanner

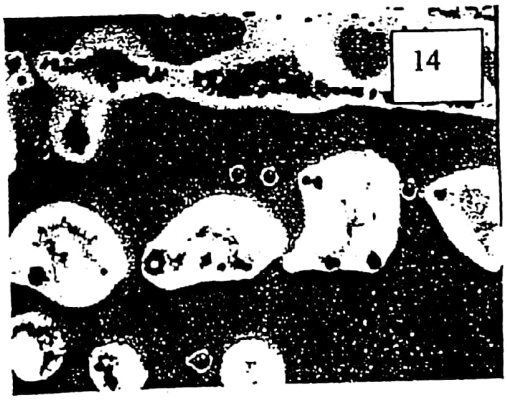


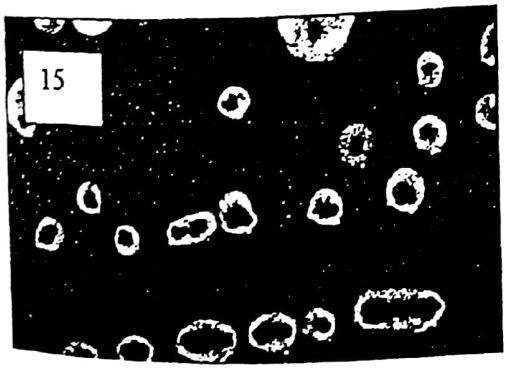


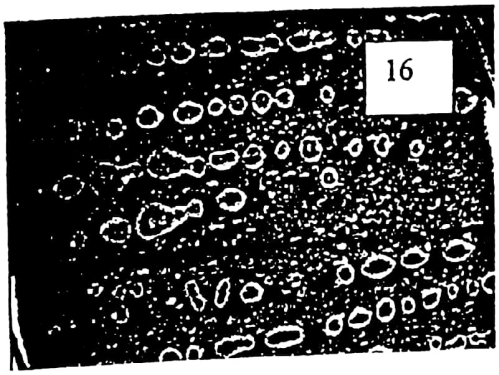












Scanned by CamScanner

ชีววิทยา และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* ด้วยเทคนิค Rep-PCR

Biology and genetic variation of *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* using Rep-PCR

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ชีววิทยาของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* (XCV) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ มีลักษณะโคโลนีมันเยิ้ม กลมสีเหลืองบนอาหาร Nutrient agar (NA) และ Yeast extract dextrose $CaCO_3$ agar (YDC) การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี พบว่าส่วนใหญ่สามารถย่อยเจลาติน และย่อยแป้ง มีปฏิกิริยาคะตาเลสบวก ไม่รีดิวซ์ไน เตรท สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส ไรโบส ราฟฟิโนส และแมนโนส โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลแมนนิทอล ทดสอบการเกิดโรคโดยการปลูกเชื้อจำนวน 27 สายพันธุ์ บนใบมะเขือเทศ พบว่าเชื้อแสดงลักษณะความรุนแรงในการเกิดโรคได้ต่างกัน ตั้งแต่ 0-50 เปอร์เซ็นต์ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ XCV เปรียบเทียบกับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pathovars อื่นๆ ด้วย ERIC และ BOX-PCR ได้ลายพิมพ์ดีเอนเอของเชื้อที่มีแถบดีเอนเออยู่ในช่วง 200-3,000 base pairs (bp) จำนวน 4-16 แถบ จากการวิเคราะห์ข้อมูลร่วมของลายพิมพ์ดีเอนเอจากไพรเมอร์ทั้งสองชนิด โดย NTSYS version 2.01 (Rohlf, 1994) แบ่งเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม โดยจัดกลุ่มเชื้อ XCV สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ 60-70% อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ที่ค่า similarity 50 % แสดงให้เห็นว่าเชื้อ XCV มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ แต่การจัดกลุ่มตามลักษณะทางพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการเกิดโรค หรือลักษณะทางชีวเคมีอื่น

คำนำ

Xanthomonas campestris pv.*vesicatoria* (Doidge) Dye เป็นเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุด (Bacterial spot) มีชื่อเรียกต่างๆ ตามอาการ เช่น โรคแผลสะเก็ด หรือโรคสะเด็ดดำ ของมะเขือเทศ ซึ่งระบาดทำความเสียหายมากในฤดูฝนหรือช่วงที่อากาศมีความชื้นสูง ทำให้ผลผลิตมะเขือเทศลดลงมากถึง 53 เปอร์เซ็นต์ (สุภลักษณ์,2536) เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายมะเขือเทศได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และทุกส่วนของต้นที่อยู่เหนือดิน อาการเริ่มแรกใบจะมีอาการจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ ต่อมาแผลจะขยายใหญ่เป็นสีเทาดำ ขอบแผลอาจมีวงสีเหลืองล้อมรอบ ถ้าอาการรุนแรงแผลจะลามใหญ่ ทำให้ใบแห้งตาย อาการบนลำต้น กิ่ง และก้านใบ เป็นแผลตกสะเก็ดสีเทา แผลยาวไปตามความยาวของลำต้น อาการบนผลอ่อน เริ่มเป็นแผลจุดช้ำสีดำ ขยายเป็นแผลกลมมีขอบนูนหนาสีเข้ม เนื้อเยื่อกลางแผลยุบตัวลง ถ้าระบาดรุนแรงดอกและผลจะร่วง

ลักษณะโดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่ง แกรมลบ ต้องการอากาศในการเจริญ เคลื่อนที่ได้ด้วยหางหนึ่งเส้นที่ขั้ว ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YDC และ NA สีเหลืองกลม ผิวมัน ขอบเรียบ พืชอาศัยที่สำคัญได้แก่ มะเขือเทศ พริก และพืชที่อยู่ในตระกูลมะเขือ รวมถึงวัชพืช เชื้อแบคทีเรียมีวงจรการเข้าทำลายพืช โดยอาศัยอยู่ในเมล็ดพันธุ์ เศษซากพืช ดิน และบริเวณรากของพืชที่ไม่เป็นพืชอาศัย (Bashan et al. 1982) จำแนกเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะการเข้าทำลายพืชอาศัย คือ XCV-T สายพันธุ์ที่ทำลายมะเขือเทศ XCV-P เข้าทำลายพริก และ XCV-PT เข้าทำลายทั้งพริกและมะเขือเทศ และจำแนกออกเป็น race 0 1 2 และ 3 ตามปฏิกิริยาการตายเฉียบพลัน (HR) บนพริก 4 พันธุ์ ทั้งนี้พบว่าเชื้อมีอัตราการกลายพันธุ์หรือการเปลี่ยนแปลง race สูง และมีความสามารถในการปรับตัวให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินและสารประกอบทองแดง (Cook และ Stall, 1982)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. campestris* โดยเทคนิคต่าง ๆ เช่น ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. campestris* pathovars โดย rRNA gene restriction patterns (Berthier et al. 1993) การจำแนกความแตกต่างทาง pathovars ของเชื้อ *X. campestris* โดยเทคนิค RFLP (Lazo et al. 1987) และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ของ *X. fragariae* โดยเทคนิค RAPD (Pooler et al. 1996) วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาชีววิทยาและความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ในประเทศไทย สำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานติดตามการแพร่ระบาดของเชื้อ การวางแผนป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ และเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัณฐานวิทยา และคุณสมบัติชีวเคมีของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*

ทำการแยกเชื้อจากมะเขือเทศที่แสดงอาการใบจุดมีวงสีเหลืองล้อมรอบ อาการแผลสะเก็ดดำ และอาการผลจุดฉ่ำน้ำ โดยตัดส่วนที่เกิดโรคเป็นชิ้นเล็กๆ ล้างด้วยน้ำกรองฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดน้ำกรองฆ่าเชื้อบนชิ้นส่วนพืช บดด้วยแท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ จนเซลล์พืชแตก ทิ้งไว้ 3-5 นาที ใช้ลูปลนไฟฆ่าเชื้อแตะไปลากบนอาหาร Yeast Extract Dextrose (YDC) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 วัน เลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีเหลือง กลมนูน มาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร YDC หรือ NA และขอความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช โดยเชื้อ *X. campestris* pv.*vesicatoria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริก เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า เชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว เชื้อ *X. campestris* สาเหตุโรคใบแห้งหอมหัวใหญ่ ที่ใช้ในการศึกษา จำนวน 37 สายพันธุ์ แสดงในตารางที่ 1

ทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหาร YDC หรือ NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็มละลายในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือผสมเชื้อในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

ศึกษาลักษณะโคโลนี และการเจริญของเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ เลี้ยงเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* บริสุทธิ์บนอาหาร YDC ใช้ลูปฆ่าเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวละลายในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วนำไปลากบนอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ YDC, NA, SX และ Tween บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน บันทึกลักษณะโคโลนีและการเจริญของเชื้อ หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 36-72 ชั่วโมง

ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การย่อยเจลาติน และย่อยแป้ง ปฏิกิริยาคะตาเลส การรีดิวซ์ไนเตรท การสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส ไรโบส ราฟฟิโนส แมนโนส และแมนนิทอล (Krieg และ Holt, 1984)

2. ปฏิกิริยาการเกิดโรค และความรุนแรงบนพืชอาศัย

<u>การเตรียมต้นมะเขือเทศ</u> โดยการเพาะเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดา อายุ 20-30 วัน เมื่อต้นกล้าสูงประมาณ 3-4 นิ้ว ย้ายปลูกลงดินผสมในกระถางอิฐขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 นิ้ว ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ทำการปลูกเชื้อทดสอบ เมื่อพืชอาศัยอายุ 45-60 วัน

<u>การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย</u> โดยเลี้ยงเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* บริสุทธิ์ จำนวน 27 สายพันธุ์บนอาหาร NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 36 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ ด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับให้เซลล์แขวนลอยเชื้อมีความขุ่น 0.1 OD ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ซึ่งจะมีเชื้อแบคทีเรียประมาณ $2x10^8$ cfu/ml

<u>การปลูกเชื้อ</u> โดยการทำแผลบนใบพืชด้วยผงคาร์บอแรนดัม (ผงซิลิคอนคาร์ไบด์) ขนาด 600 mesh จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ทาบนใบทุกใบ โดยมีใบมะเขือเทศเฉลี่ยประมาณ 10-15 ใบต่อ

ต้น ใช้พืช 1 ต้นต่อสายพันธุ์ คลุมด้วยถุงพลาสติก พ่นละอองน้ำ ให้ความชื้นทิ้งไว้ข้ามคืน เปิดถุงพลาสติกออก เก็บต้นพืชที่ปลูกเชื้อไว้ในโรงเรือนบันทึกข้อมูลการเกิดโรคหลังปลูกเชื้อ 3, 5, 7 และ 14 วัน ให้ระดับความรุนแรงการเกิดโรคโดยประเมินอาการทั้งต้น ดังนี้

0 พืชไม่แสดงอาการโรค

+1 พืชแสดงอาการใบจุด 1-10%

+2 พืชแสดงอาการใบจุด 11-25%

+3 พืชแสดงอาการใบจุด 26-50%

+4 พืชแสดงอาการใบจุด 51-75%

3. ลายพิมพ์ดีเอนเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ โดย BOX และ ERIC PCR

ทำการสกัดดีเอนเอ โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย บนอาหาร YDC ใช้ลูปลนไฟฆ่าเชื้อ แตะโคโลนีเดี่ยว ปลูกเชื้อลงในอาหารเหลว modified YP (3 กรัม yeast extract และ 5 กรัม peptone ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) ในหลอดทดลองปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อหลอด บ่มเชื้อไว้ข้ามคืนบนเครื่องเขย่า (Orbit shaker : LAB-Line Instruments Inc. , ILL) ความเร็ว 125 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อในอาหารเหลว ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 32, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างตะกอนเซลล์ เพื่อกำจัดโพลีแซคคาไรด์ ด้วยน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ดูดขึ้นลงให้เชื้อกระจาย ปั่นอย่างเร็วด้วย vortex 5 วินาที ปั่นตกตะกอนทิ้งส่วนใส ล้างเซลล์เช่นเดิม 3 รอบ เก็บตะกอนเซลล์ นำไปสกัดดีเอนเอ ด้วย ชุดสกัด Puregene kit (Invitrogen Inc., Minneapolis, MN) ตามวิธีของชุดสกัด และปรับขั้นตอนบางส่วน ดังนี้ เติมสารละลายเซลล์ (cell lysis solution) ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้ตะกอนเซลล์กระจาย บ่มหลอดที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียสลาย ทิ้งให้เย็น แล้วเติม 1.5 ไมโครลิตร Rnase A เพื่อกำจัด RNA บ่มหลอดไว้ในน้ำอุ่น 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ทิ้งให้เย็นลง ตกตะกอนโปรตีน โดยเติมสารละลาย protein precipitation 100 ไมโครลิตร ปั่นอย่างแรงด้วย vortex นาน 20 วินาที แล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 14000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ตกตะกอนดีเอนเอ โดยดูดสารส่วนใส ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ isopropanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนดีเอนเอที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 2นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 70 % เอทธานอล 3 ครั้ง อบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อระเหยแอลกอฮอล์ ละลายตะกอนดีเอนเอ ด้วยบัฟเฟอร์ (TE 0.1 M pH 7.0) ปริมาณ 30 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และเจือจางดีเอนเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อใช้ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นต่อไป

ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์ Box ที่ออกแบบจากส่วน interspersed repetitive Box sequence และไพรเมอร์ ERIC ที่ออกแบบจากส่วน enterobacteria repetitive intergenic consensus (Louws และคณะ, 1994) ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

BOX	(BOXA1R)	5’-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3’
ERIC	(ERIC1R)	5’-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3’
	(ERIC2)	5’-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3’

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณสายดีเอนเอโดยใช้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)/ 25 ไมโครลิตร	
5x Gitschier Buffer[1]	5	
BSA, 20 mg/ml	0.2	
DMSO, 100%	2.5	
dNTP’s (25mM)	1.25	
ไพรเมอร์ 1 (25μM)	1	
ไพรเมอร์ 2 (25 μM)*	1	(*เฉพาะ ERIC-PCR)
Taq DNA polymerase 5 U/ ul	0.4	
ดีเอนเอเชื้อ 50 นาโนกรัม	0.5	
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	เติมให้ครบ 25 ไมโครลิตร	

[1]5xGitshier Buffer (Kogan et al. 1987) ประกอบด้วย 1 M $(NH_4)_2So_4$, 1 M Tris-HCl (pH 8.8), 1 M $MgCl_2$ และ 0.5 M EDTA (pH 8.8)

ผสมสารดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน แล้วบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ PE 2400 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอนเอดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา (นาที)	
1.แยกสายดีเอนเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation)	95	7	
2.แยกสายดีเอนเอแม่แบบ (denaturation)	94	1	30 รอบ
3.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอนเอต้นแบบ (annealing)	53	1	30 รอบ
4.สังเคราะห์สายดีเอนเอต่อจากดีเอนเอแม่แบบ(extension)	65	8	30 รอบ
5.สังเคราะหดีเอนเอรอบสุดท้าย (final extension)	65	15	

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอนเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอนเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (Promega,Madison, WI) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอนเอด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส ใช้ 1.5% อะกาโรส ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 70 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอนเอภายใต้แสงยูวี และถ่ายภาพ ด้วย ultraviolet transiluminator โมเดล GDS 7500 (UVP, Upland, CA)

บันทึกข้อมูลโดย การตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอนเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 200-3000 bp ให้คะแนนแถบดีเอนเอที่ ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอนเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Numerical Taxonomy and Multivariation Analysis System (NYSYS, version 2.01d) (Rohlf, 1994) วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่างสายพันธุ์ และสปีชีส์ แหล่งที่มาของเชื้อ ความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค

ผลและวิจารณ์

1. สัณฐานวิทยา และคุณสมบัติชีวเคมีของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*

ลักษณะโคโลนี ของเชื้อ *X. campestris* pv.*vesicatoria* ที่เป็นสาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและพริก เชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า เชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว เชื้อ *X. campestris* หอมหัวใหญ่ แต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารชนิดเดียวกันไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ลักษณะโคโลนีของทุกเชื้อบนอาหารที่ต่างกันแสดงความแตกต่างของลักษณะโคโลนีดังนี้ (ภาพที่ 1)

อาหารแข็ง	ลักษณะโคโลนี	ขนาด (มม.)	ระยะเวลาในการเจริญ
YDC	สีเหลือง รูปร่างกลมนูน ผิวเป็นมัน	2-4	24-48 ชม.
NA	สีเหลืองอ่อน รูปร่างกลมนูน ผิวเป็นมัน	2-4	24-48 ชม.
Tween 80	สีขาวขุ่น รูปร่างกลม	2-3	24-48 ชม.
SX	สีเหลืองอมเขียวอ่อน ย่อยแป้งเห็นเป็นรอยใส รอบโคโลนี	1-2	48-70 ชม.

ผลการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมี พบว่าเชื้อ *X. Campestris* pv. *vesicatoria* และเชื้อ *X. campestris* pathovar ส่วนใหญ่สามารถย่อยเจลาติน และย่อยแป้ง มีปฏิกิริยาคะตาเลสบวก ไม่รีดิวซ์ไนเตรท สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส ไรโบส ราฟฟิโนส

และแมนโนส โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลแมนนิทอล (ตารางที่ 2) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวตรงกับคุณลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *X. campestris* (Krieg and Holt, 1984) สำหรับคุณสมบัติการสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดต่างๆ พบว่า 11-89 % ของเชื้อ *X. campestris* ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก ความผันแปรดังกล่าวอาจเนื่องจากคุณสมบัติการเข้าทำลายพืชอาศัยที่ต่างกันซึ่งมีการจัดจำแนกเป็น parthovar ซึ่งมีมากกว่า 30 parthovars ทั่วโลก (Schaad et al. 2001) โดยพบในประเทศไทยมากกว่า 10 parthovars (วิชัย, 2531) ทั้งนี้คุณสมบัติทางชีวเคมีไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในและระหว่าง parthovars ของเชื้อ *X. Campestris* ได้

2. ปฏิกิริยาการเกิดโรค และความรุนแรงบนพืชอาศัย

ผลการปลูกเชื้อเพื่อทดสอบปฏิกิริยาการก่อให้เกิดโรคของเชื้อ *X. campestris* pv.*vesicatoria* จำนวน 27 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ สามารถเข้าทำลายพืช แสดงอาการใบจุดหลังจากปลูกเชื้อ 5-7 วัน โดยอาการเริ่มแรกใบจะแสดงจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ ต่อมาจะขยายใหญ่ขึ้น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แผลเป็นสีน้ำตาลดำ ตรงกลางแผลอาจมีลักษณะการยุบตัวสีเข้ม ขอบแผลมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ ถ้าอาการรุนแรงขึ้นแผลจะลามถึงกันทำให้ใบเหลืองแห้งตาย

เชื้อแต่ละสายพันธุ์ แสดงความรุนแรงในการเกิดโรค บนมะเขือเทศ ได้ต่างกัน โดยพบความรุนแรงเฉลี่ยของอาการใบจุด ตั้งแต่ 0-50 เปอร์เซ็นต์ จัดแบ่งกลุ่มความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรค ได้ 5 กลุ่ม (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของเชื้อ การจัดกลุ่มเชื้อตามการเข้าทำลายพืชอาศัยโดย Cook และ Stall (1982) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Tomato strain (XCV T) เข้าทำลายมะเขือเทศ กลุ่ม Pepper strain (XCV P) เข้าทำลายพริก และกลุ่ม Pepper-tomato strain (XCV PT) เข้าทำลายทั้งพริกและมะเขือเทศ ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *vesicatoria* สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะการเจริญ และทุกส่วนที่อยู่เหนือดิน ได้แก่ ใบ กิ่ง ก้านใบ ลำต้น และผล (ศุภลักษณ์, 2536; Jone et al. 1991; CPC, 2003)

3. ลายพิมพ์ดีเอนเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ โดย BOX และ ERIC PCR

ลายพิมพ์ดีเอนเอโดยไพรเมอร์ BOX ของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จำนวน 37 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอนเอของเชื้อ *X. campestris* pathovars สาเหตุโรคแคงเคอร์มะนาว 1 สายพันธุ์ โรคใบแห้งคะน้า 2 สายพันธุ์ โรคใบไหม้ของหน้าวัว 2 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์แสดงแถบดีเอนเอที่มีขนาดตั้งแต่ 200-3000 bp จำนวน 6-11 แถบ โดยรูปแบบของแถบดีเอนเอเชื้อแบคทีเรียทั้ง 42 สายพันธุ์ เมื่อนำตัวอย่างสายพันธุ์เชื้อที่เป็นตัวแทนที่มีรูปแบบแตกต่างกัน 12 รูปแบบ (ภาพที่ 1) พบแถบดีเอนเอที่ปรากฏแตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 29 polymorphic เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบดีเอนเอ (ภาพที่ 2) สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จำนวน 37 สายพันธุ์ และเชื้อ *X. campestris* ที่เป็นสาเหตุโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่ 1 สายพันธุ์ มีค่า similarity coefficient 73% กลุ่มที่ 2 มีค่า similarity coefficient 64% เป็นกลุ่มของเชื้อโรคใบแห้งคะน้า 2 สายพันธุ์ (similarity coefficient 75%) และโรคแคงเคอร์มะนาว 1 สายพันธุ์ ส่วนอีก 2 สาย

พันธุ์ เป็นเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว ที่มีความสัมพันธ์กันที่ค่า similarity coefficient น้อยกว่า 50%

ลายพิมพ์ดีเอนเอ โดย ERIC primer พบแถบดีเอนเอที่มีขนาดตั้งแต่ 200-3000 bp จำนวน 4-16 แถบ เมื่อนำตัวอย่างสายพันธุ์เชื้อที่เป็นตัวแทนที่มีรูปแบบแตกต่างกัน 12 รูปแบบ (ภาพที่ 3) มีแถบดีเอนเอที่ปรากฏแตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 29 polymorphic ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของรูปแบบแถบดีเอนเอ (ภาพที่ 4) แบ่งกลุ่มเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จำนวน 35 สายพันธุ์ มีค่า similarity coefficient 65% กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 เชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สายพันธุ์จากพริก และ *X. campestris* ที่เป็นสาเหตุโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่ 2 สายพันธุ์ มีค่า similarity coefficient 70% กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคใบแห้งคะน้า 2 สายพันธุ์ มีค่า similarity coefficient 72%

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอนเอของเชื้อ โดยข้อมูลจาก BOX และ ERIC primer มีแถบดีเอนเอที่แตกต่างกัน 58 polymorphic สามารถจัดแบ่งเชื้อออกได้เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* 34 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สายพันธุ์จากพริก 1 สายพันธุ์ และ *X. campestris* ที่เป็นสาเหตุโรคใบแห้งของหอมหัวใหญ่ 1 สายพันธุ์ โดยทั้งสองกลุ่มมีค่า similarity coefficient เท่ากันคือ 68% กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคใบแห้งคะน้า 2 สายพันธุ์ มีค่า similarity coefficient 72% และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* 2 สายพันธุ์ ในการศึกษาขั้นต่อไปควรเพิ่มจำนวนสายพันธ์เชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่เป็นสาเหตุโรคในพริก และรวมถึงเชื้อใน pathovars อื่นๆ

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอนเอพบว่ามีแนวโน้มการรวมกลุ่มกันของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ โดยภายในกลุ่มเชื้อยังพบความหลากหลายทางสายพันธุ์ เมื่อเปรียบเทียบกับ แหล่งที่มาของเชื้อ และ ความรุนแรงในการเกิดโรค ไม่พบความสัมพันธ์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ ศุทธนา , 2542 ในการจำแนกเชื้อ *Ralstonia solanacearum* พบว่าการจัดกลุ่มระดับพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Rep-PCR ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของเชื้อ ต่างจากการศึกษาของ กุลชนา (2544) พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถจำแนกสายพันธุ์เชื้อ *X. campestris* pv.*glycines* ที่มีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค คือสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อที่เป็นสายพันธุ์อ่อนแอและสายพันธุ์ที่รุนแรงได้ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาของเชื้อ หรือพันธุ์ของถั่วเหลือง

สรุป

1. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pathovars ต่างๆ บนอาหารชนิดเดียวกันไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อได้ บนอาหาร YDC, NA และ Tween 80 เชื้อเจริญภายใน 24-48 ชั่วโมง และบนอาหาร SX เชื้อเจริญภายใน 48-72 ชั่วโมง

2. คุณสมบัติทางชีวเคมีของ เชื้อ *X. Campestris* pv. *vesicatoria* และเชื้อ *X. campestris* pathovar ส่วนใหญ่สามารถย่อยเจลาติน และย่อยแป้ง มีปฏิกิริยาคะตาเลสบวก ไม่รีดิวซ์ไนเตรท สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลอะราบิโนส กาแลคโตส ทรีฮาโลส ฟรุคโตส มอลโตส ไซโลส ไรโบส ราฟฟิโนส และแมนโนส โดยเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สร้างกรดจากน้ำตาลแมนนิทอล

3. เชื้อ *X. campestris* pv.*vesicatoria* แต่ละสายพันธุ์ สามารถเข้าทำลายพืช แสดงอาการใบจุดหลังจากปลูกเชื้อ 5-7 วัน โดยอาการเริ่มแรกใบจะแสดงจุดฉ่ำน้ำเล็กๆ ต่อมาจะขยายใหญ่ขึ้น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แผลเป็นสีน้ำตาลดำ ตรงกลางแผลอาจมีลักษณะการยุบตัวสีเข้ม ขอบแผลอาจมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบ ถ้าอาการรุนแรงขึ้นแผลจะลามถึงกันทำให้ใบเหลืองแห้งตาย

4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ ลายพิมพ์ดีเอนเอ โดยเทคนิค rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ BOX และ ERIC พบแนวโน้มการรวมกลุ่มกันของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศ โดยภายในกลุ่มเชื้อมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของกลุ่มเชื้อ กับ แหล่งที่มา และความรุนแรงในการเกิดโรค

คำนิยม

ขอขอบคุณ กลุ่มงานบักเตรีวิทยา ที่เอื้อเฟื้อเชื้อ *Xanthomonas campestris* pathovar ต่างๆ ขอบคุณ คุณเอื้อมขวัญ จันเต็ม และคุณรสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง ผู้ช่วยในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กุลชนา เกศสุวรรณ์. 2544. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*glycines* ด้วยเทคนิค rep-PCR. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย โฆสิตรัตน. 2531. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 133 หน้า

ศุทธนา คล้ายมลคล วิชัย โฆสิตรัตน และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2543. การประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากพริกที่เป็นโรคเหี่ยว. เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2543.

ศุภลักษณ์ ฮอกะวัต. 2536. โรคผักตระกูลพริกและมะเขือเทศ. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 249 หน้า.

Bashan, Y., S. Diab and Y. Okon. 1982. Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

in pepper seeds and roots, in symptomless and dry leaves in non-host plants and in the soil. Plant and Soil 68: 161-170.

Berthier, Y., V. Verdier, J. L. Guesdon, D. Chevrier, J. B. Denis, G. Decoux, and M. Lemattre. 1993. Characterization of *Xanthomonas campestris* pathovars by rRNA gene restriction patterns. Appl. Environ. Microbiol. 59: 851-859

Cook, A. A. and R. E. Stall. 1982. Distribution of races of *Xanthomonas vesicatoria* pathogenic on pepper. Plant Disease 66:388-389.

Crop Protection Compendium. 2003. Data Sheet on Quarantine Pests *Xanthomonas Vesicatoria*. CAB International, Wallingford, UK.

Jones, J. B., J. P. Jones, R. E. Stall and T. A. Zitter. (eds.) 1991. Compendium of Tomato Diseases. APS Press. St. Paul. Minnesota, U.S.A. 73 p.

Krieg, N. R. and Holt, J. G. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. William and Wikins Company, Baltimore. 1599 p.

Lazo, G. R., R. Roffey and D.W. Gabriel. 1987. Pathovars of *Xanthomonas campestris* are distinguishable by restriction fragment length polymorphisms. Int. J. Syst. Bacteriol. 37:214-221

Pooler, M. R., D.F. Ritchie, and J. S. Hartung. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA, PCR repetitive extragenic palindromic PCR, and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. Appl. Env. Microbiol. 62: 3121-3127

Rohlf, F. J. 1994. NTSTSpc Numerical taxonomy and multivariate analysis system version2.01d, Applied Biostatistics Inc. New York.

Schaad, N. W., J. B. Jones, and G. H. Lacy. 2001. *Xanthomonas*. pp. 175-200. *In* Schaad, N. W., J. B. Jones, and W. Chun (eds). Laboratory guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria 3rd edition. APS Press. 373 p.

ตารางที่ 1 สายพันธุ์เชื้อ และแหล่งที่มา ของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* และ *Xanthomonas campestris* pathovars ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อ/ สายพันธุ์	พืชอาศัย	สถานที่ปลูก (จังหวัด)	แหล่งที่มาของเชื้อ
X. campestris* pv. *vesicatoria			
Xcv1	มะเขือเทศ	นครราชสีมา	การศึกษานี้
Xcv2	มะเขือเทศ	นครราชสีมา	การศึกษานี้
Xcv3	มะเขือเทศ	กาญจนบุรี	การศึกษานี้
Xcv5	มะเขือเทศ	เชียงใหม่	การศึกษานี้
Xcv7	มะเขือเทศ	สระบุรี	การศึกษานี้
Xcv8	มะเขือเทศ	นครราชสีมา	การศึกษานี้
Xcv691	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1643	มะเขือเทศ	สระบุรี	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1644	มะเขือเทศ	สระบุรี	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1646	มะเขือเทศ	สระบุรี	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1662	มะเขือเทศ	นครราชสีมา	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1663	มะเขือเทศ	สระบุรี	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1664	มะเขือเทศ	สระบุรี	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1665	มะเขือเทศ	นครราชสีมา	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1691	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1696	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1697	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1698	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1699	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1700	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1702	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1703	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1704	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1705	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1706	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1707	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1709	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1710	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1711	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา

เชื้อ/ สายพันธุ์	พืชอาศัย	สถานที่ปลูก (จังหวัด)	แหล่งที่มาของเชื้อ
Xcv1712	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1713	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1714	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv1715	มะเขือเทศ	สกลนคร	กลุ่มบักเตรีวิทยา
Xcv10	พริก	สุพรรณบุรี	การศึกษานี้
Xcv11	พริก	สุพรรณบุรี	การศึกษานี้
X. campestris* pv. *campestris			
Xcc12	คะน้า	กาญจนบุรี	การศึกษานี้
Xcc1675	คะน้า	กาญจนบุรี	การศึกษานี้
X.campestris* pv. *dieffenbachiae			
Xcd14	หน้าวัว	นครราชสีมา	การศึกษานี้
Xcd28	หน้าวัว	นครปฐม	การศึกษานี้
X. campestris* pv. *citri			
Xci	มะนาว	เพชรบุรี	การศึกษานี้

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*, *X. campestris*, *X. campestris* pv.*campestris* และ *X. campestris* pv.*dieffenbachiae*

คุณสมบัติชีวเคมี	เชื้อ/สายพันธุ์เชื้อ[a]					
	XC	Xcv7	Xcv691	Xcv10	Xcc12	Xad14
Mucoid grouth on nutrient agar +	+	+	+	+	+	+
5% glucose						
Xanthomonadins produced	+	nd	nd	nd	nd	nd
Hydrolysis of:						
Gelatin	d	+	+	+	+	+
Esculin	+	nd	nd	nd	nd	nd
Starch	d	+	+	-	-	+
Milk protolysis	+	nd	nd	nd	nd	nd
H_2S from peptone	+	nd	nd	nd	nd	nd
Urease activity	-	nd	nd	nd	nd	nd
Maximum growth temperature (^oC)	35-39	nd	nd	nd	Nd	nd
Maximum NaCl tolerance, %	2.0-5.0	nd	nd	nd	nd	nd
Growth on nutrient agar:						
Good	+	+	+	+	+	+
Poor to very poor	-	-	-	-	-	-
No growth	-	-	-	-	-	-
Growth rate in culture:						
Moderate	+	+	+	+	+	+
Slow to very slow	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Nitrate reductase	-	-	-	-	-	-
Utilization of:						
Acetate	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+
Succinate	+	+	+	+	+	+
Benzoate	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+

คุณสมบัติชีวเคมี	เชื้อ/ สายพันธุ์เชื้อ[a]					
	XC	Xcv7	Xcv691	Xcv10	Xcc12	Xad14
Acid production within 21 days on Dye's medium C from:						
Fructose	+	nd	nd	nd	nd	nd
Maltose	d	+	+	+	+	+
Xylose	d	+	+	+	+	+
Ribose	d	+	+	+	+	+
Raffinose	d	+	+	+	+	+
Melezitose	d	+	+	+	+	+
Dextrin	d	+	+	+	+	+
Glycerol	d	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	+	+	+	+	+
Adonitol	-	nd	nd	nd	nd	nd
Lactose	d	nd	nd	nd	nd	nd
Cellobiose	+	nd	nd	nd	nd	nd
Sorbitol	-	nd	nd	nd	nd	nd

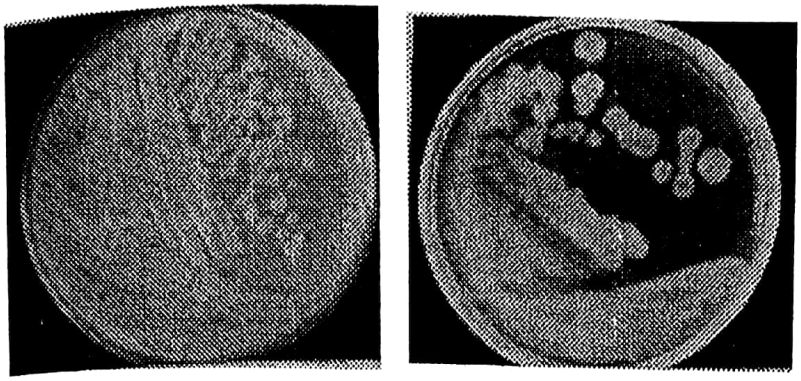
[a]สายพันธุ์เชื้อ XC= *Xanthomonas campestris* จาก Bergey's manual of systematic bacteriology (Krieg and Holt, 1984), Xcv7 และ Xcv691 เป็นข้อมูลแทนเชื้อ *X. campestris* pv.*vesicatoria* จากมะเขือเทศ 37สายพันธุ์, Xcv10 เชื้อ *X. campestris* pv.*vesicatoria* สายพันธุ์จากพริก, Xcc12 เชื้อ *X. campestris* pv.*campestris* จากคะน้า 2 สายพันธุ์ และ Xcd14 เชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* จากหน้าวัว 2 สายพันธุ์

d= 11-89% ผลการทดสอบเป็นบวก, nd= ไม่ได้ทดสอบ

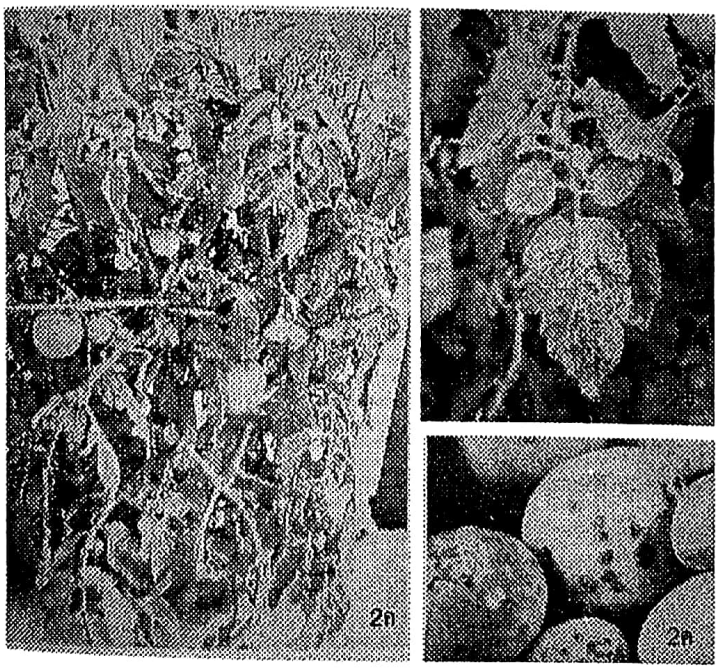
ตารางที่ 3 แสดงการจัดกลุ่มความรุนแรงในการเกิดโรคของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria* จากการปลูกเชื้อบนต้นมะเขือเทศ พันธุ์สีดา อายุ 45 วัน

กลุ่มที่	เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค[a]	สายพันธุ์
1	ไม่ก่อให้เกิดโรค 0%	691, 1665, 1675, 1702
2	พืชเกิดโรค 1-10%	1642, 1645, 1768, 1699, 1696, 1698, 1708
3	พืชเกิดโรค 11- 25%	3, 1643, 1662, 1664, 1673, 1699, 1700, 1703
4	พืชเกิดโรค 26-50%	6, 1644, 1646, 1691, 1704, 1706, 1710
5	พืชเกิดโรคมากกว่า 50%	1713, 12, 1709

[a]เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเฉลี่ยจากการประเมินพื้นที่ใบที่แสดงอาการโรคใบจุด ของมะเขือเทศทั้งต้น (ประมาณ 10-15 ใบ)

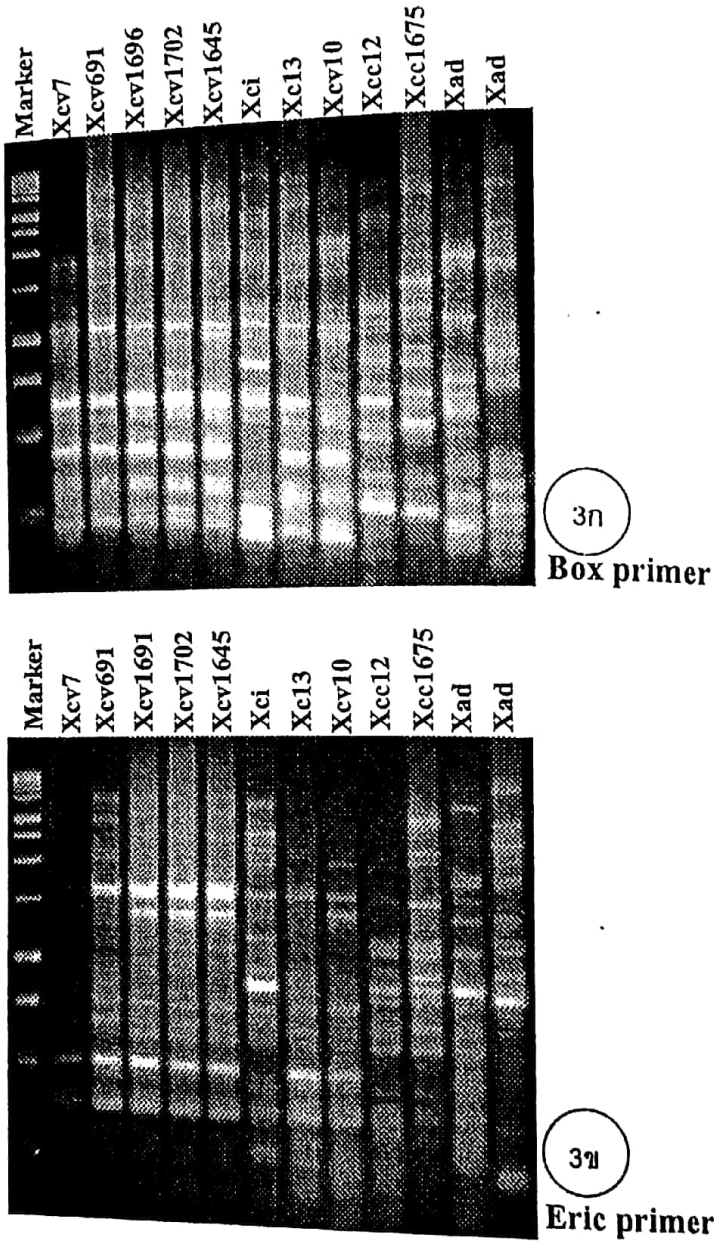


ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียมะเขือเทศ บนอาหาร YDC, 1ก และบนอาหาร SX, 1ข



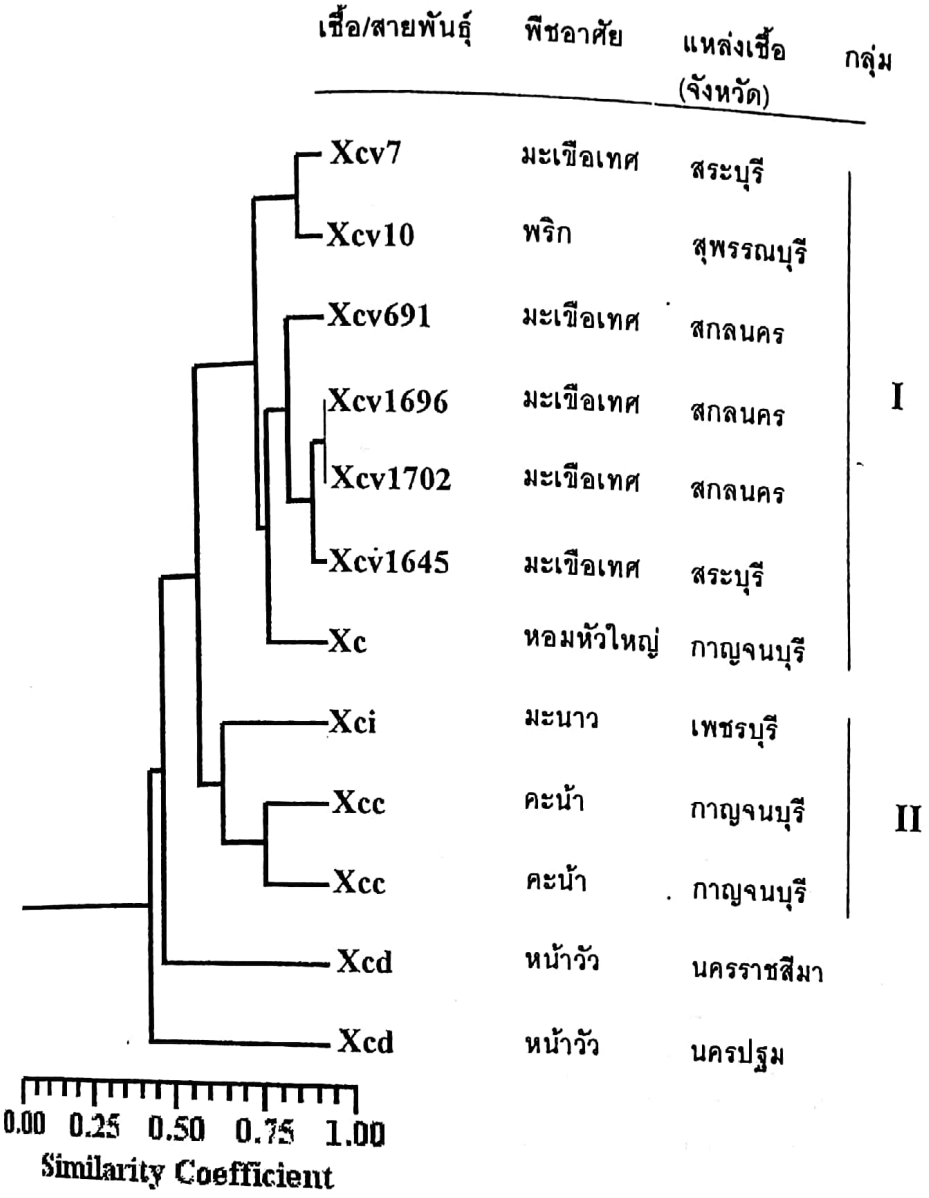
ภาพที่ 2 ลักษณะอาการโรคใบจุดและผลจุดแบคทีเรียของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* , อาการการเข้าทำลายต้นมะเขือเทศ 2ก, อาการที่ใบ 2ข, อาการที่ผล 2ค

Scanned by CamScanner



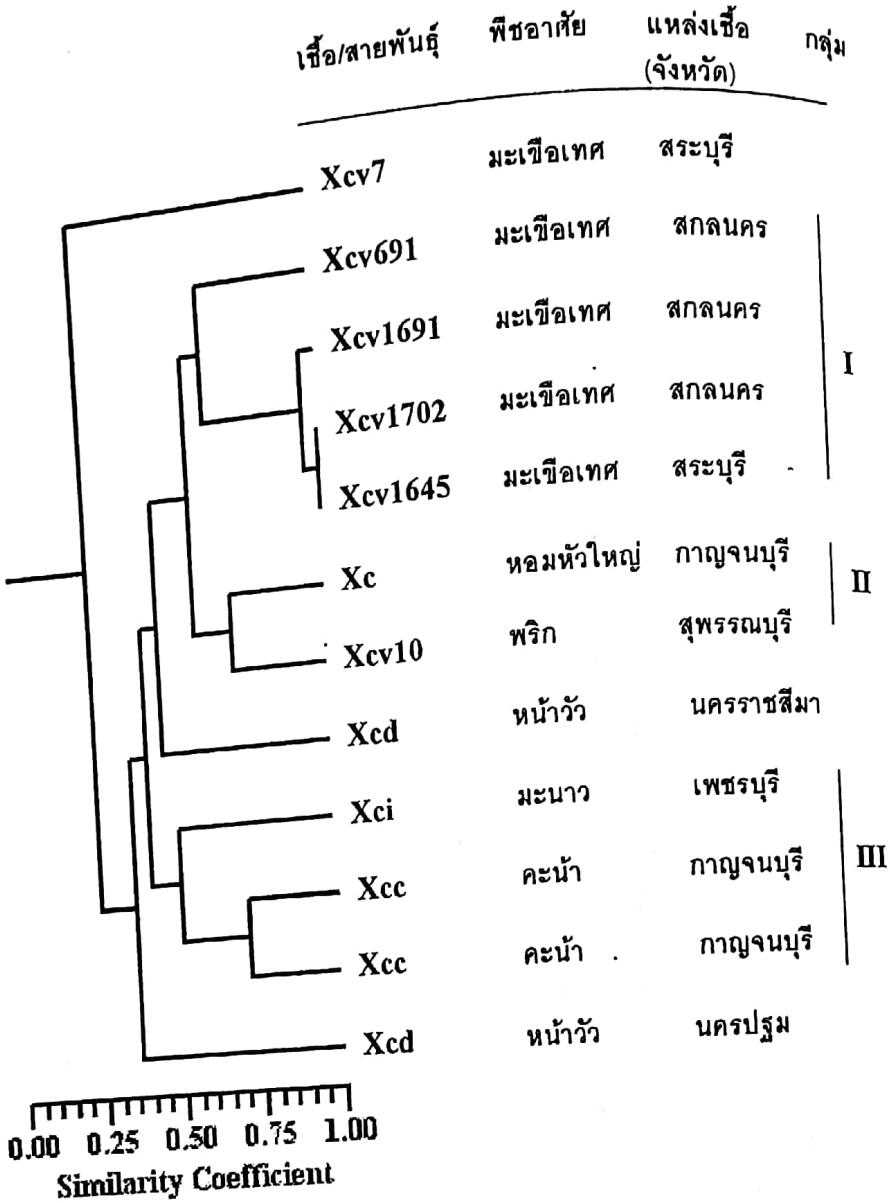
ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอนเอของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (คู่ที่ 2-6 และ9) เปรียบเทียบกับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* (คู่ที่ 7) *X. campestris* (คู่ที่ 8) *X. campestris* pv. *campestris* (คู่ที่ 10-11) และเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (คู่ที่ 12) 3ก, ลายพิมพ์ดีเอนเอโดยไพรเมอร์ Box, 3ข, ลายพิมพ์ดีเอนเอโดยไพรเมอร์ Eric

Scanned by CamScanner



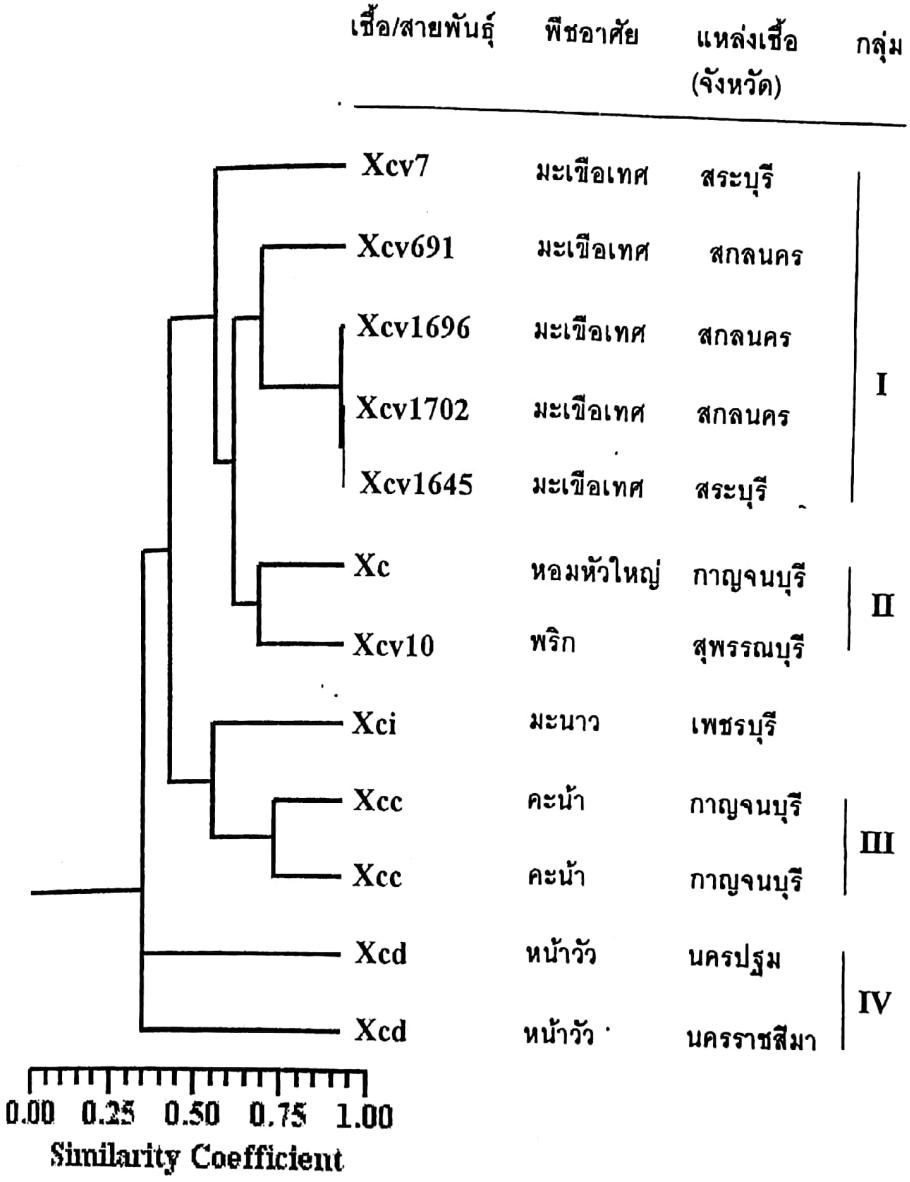
ภาพที่ 4 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* (xci), *X. campestris* (Xc), *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) และเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (Xad) ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอนเอของ Rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ Box วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc, version 2.01

Scanned by CamScanner



ภาพที่ 5 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV) กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* (xci), *X. campestris* (Xc), *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) และเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (Xad) ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอนเอของ Rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ ERIC วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc, version 2.01

Scanned by CamScanner



ภาพที่ 6 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV) กับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri* (xci), *X. campestris* (Xc), *X. campestris* pv. *campestris* (Xcc) และเชื้อ *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* (Xad) ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอนเอของ Rep-PCR ด้วยไพรเมอร์ Box และ ERIC วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc, version 2.01

Scanned by CamScanner

คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่มีประสิทธิภาพสูง ในการสร้างแซนแทนกัม

Selection of *Xanthomonas* Isolates for High Xanthangum Production

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล

และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่เป็นสาเหตุโรคพืช จำนวน 15 ไอโซเลต ซึ่งเก็บไว้ที่หน่วย เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช ได้แก่ ST 92-063 ,CM 92-013, 1185, 1101, 920, 1058-2, TB 0004, TB 0028, 888-2 ,1057,1062,1058,1059,1487และ *X.campestris* pv. v*esicatoria* ทดสอบในห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดย นำมาสกัดสารแซนแทนกัมในอาหารเหลว Potato Sucrose broth (PSB) หรือ Wakimoto's broth โดยบ่มเชื้อ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลต 1101 (*X.c.* pv. *campestris*) สาเหตุโรคเน่าดำในกะหล่ำดอก เก็บรวบรวมจากกิ่งอำเภอควนเนียง จังหวัดสงขลา สามารถสร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณสูงสุด โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมคิดเป็นกรัมต่ออาหารเหลว100 มิลลิลิตร เท่ากับ 11.84. และ 0.77ตามลำดับ รองลงมาไดแก่ ST 92-063 (*X.c.* pv.*glycines*) สาเหตุโรคใบจุดนูนถั่วเหลือง เก็บรวบรวมจากจังหวัดสุโขทัย โดย สร้างสารแซนแทนกัมมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง คิดเป็นกรัมต่ออาหารเหลว100 มิลลิลิตร เท่ากับ 4.69 และ 0.35 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสีของผลิตภัณฑ์แซนแทนกัม บดละเอียดและความสามารถการละลายน้ำ พบว่า สารแซนแทนกัมจากไอโซเลต 1487 ((*X.c.* pv.*manihotis*) สาเหตุโรคใบไหม้มันสำปะหลัง จากจังหวัดขอนแก่น จะมีสีและการละลายในน้ำกลั่นได้ดีเท่ากับสาร Super NG^{R} ซึ่งเป็นสารแซนแทนกัมที่ผลิตจำหน่ายในระดับอุตสาหกรรม โดยที่สารแซนแทนกัมจากไอโซเลต 1101 จะมีสีใกล้เคียงกับสาร Super NG^{R} แต่ความสามารถในการละลายในน้ำกลั่นที่ 5 นาที จะต่ำกว่า Super NG^{R} แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมง พบว่าสารแซนแทนกัมจากไอโซเลต 1101 สามารถละลายในน้ำได้ถึง 100% ในขณะที่ Super NG^{R} ละลายได้ 85%

รหัสทะเบียนวิจัย 45 11004 001

คำนำ

แซนแทนกัม (Xanthan gum) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ประเภท Heteropolysaccharide ที่เชื้อแบคทีเรียสกุล *Xanthanmonas* สร้างขึ้นบริเวณผนังเซลล์ บางครั้งจึงเรียก Extracellular polysaccharide (EPS) โดยมีลักษณะเป็นแคปซูลห่อหุ้มเซลล์ไว้หลวมๆ ทำให้หลุดลอกออกง่ายเมื่อเขย่าแรงๆ โมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 ชนิด คือ D-glucose, D-mannose และ D-glucuronic acid โดยมี Pyruvyl และ acetyl group เกาะอยู่ด้วย ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้คุณสมบัติของสารแซนแทนกัมที่สร้างขึ้นมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป โดยทั่วไปแล้วสารแซนแทนกัมมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี มีความคงตัว แม้สภาพที่อุณหภูมิเปลี่ยนไป จึงนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างแพร่หลาย ค้นพบครั้งแรกในปี 1950 โดยนักวิทยาศาสตร์แห่งสถาบัน NRRL (The Northern Regional Research Laboratories) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดย Rogovin และคณะ (1961) ได้พยายามศึกษาค้นคว้าเพื่อผลิตกัมจากเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทดแทนกัมที่ผลิตจากพืชซึ่งมีปริมาณลดลงและไม่เพียงพอต่อการบริโภค โดยพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 สามารถผลิตสารแซนแทนกัมที่มีคุณสมบัติดี ซึ่งต่อมาได้นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร โดยมหาวิทยาลัยเอดินเบิร์กได้รายงานว่า ในแต่ละปีมีการผลิตสารแซนแทนกัมจากเชื้อแบคทีเรีย *X.campestris* จำนวน 20,000 ตัน เพื่อนำมาใช้อุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ยาสีฟัน เครื่องสำอาง สี ไอศกรีม สลัด และน้ำมันหล่อลื่น เป็นต้น (http://www.helios.bto.ed.aac.uk/bto/microbes/xanthan.htm) โดยใช้เป็นสารผสมเพิ่มความหนืด ช่วยให้เกิดลักษณะเป็นเจล (gelling) หรือเป็นสารรักษาความคงตัว (stabilising) ให้เกิดความคงตัวในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น เป็นส่วนผสมของสลัด ไอศกรีม ยาสีฟัน เครื่องสำอาง สีทา และน้ำมันหล่อลื่น โดยศศิธร (2536) ได้รวบรวมการใช้ประโยชน์และปริมาณการใช้สารแซนแทนกัมไว้ ดังนี้ นำมาใช้เป็นสารรักษาความคงตัว สารทำให้กระจาย 25%, สารเพิ่มความเข้ม 23%, สารทำให้เกิดฟิล์ม 17%, สาร water-retention agent 12%, สารทำให้เกิดแขวนลอย 6%, สารหล่อลื่นและลดแรงเสียดทาน 5% และ อื่นๆ 5% โดยมีปริมาณการใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ผงซักฟอกและซักรีด 16%, เส้นใย 14%, กาว 12%, กระดาษ 10%, สีทา 9%, อาหาร 8%, ยาและเครื่องสำอาง 7% และอื่นๆ 24%

แซนแทนกัมเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ ที่มีการย่อยในลำไส้น้อยและช่วยเพิ่มปริมาณกากใน ลำไส้ ไม่พบความเป็นพิษในระยะสั้น (12 อาทิตย์) และระยะยาว (2 ปี) ในสัตว์ทดลอง (หนูและสุนัข) ดังนั้นในปี 1971 สำนักงานอาหารและยาของโลก (FDA) ได้ออกประกาศอนุญาตให้ใช้สารแซนแทนกัมเติมลงในอาหารและยาได้ (ศศิธร, 2536)

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการนำสารแซนแทนกัมมาใช้ในอุตสากรรมต่างๆมากมายทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น โยเกิร์ต เนย ไอศกรีม แยม เบเกอรี่ เค้ก ซอส ฯลฯ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมสี อุตสาหกรรมน้ำมัน ผลิตภัณฑ์น้ำยาทำความสะอาด และอุตสาหกรรมเคมีเกษตร โดยประเทศไทยได้นำเข้าปีละหลายล้านบาทและมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี เช่น ในปี 1990 ได้มีการ

นำเข้ากัมคิดเป็นมูลค่าถึง 14.37 ล้าน บาท โดยเพิ่มจากปี 1989 ซึ่งประเทศไทยนำเข้ามาเป็นมูลค่า 6.3 ล้าน บาท โดยนำเข้าจาก จีน อินเดีย อังกฤษ ฮอนดูรัส ซูดาน แคนาดา สหรัฐอเมริกา เยอรมัน และญี่ปุ่น (ศศิธร, 2536) กัมชนิดต่างๆ ที่มีจำหน่ายในประเทศต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ยังไม่มีการผลิตเพื่อใช้ในประเทศ (ภาวิณี,2524) และยังไม่เพียงพอต่อความต้องการซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีเนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมต่างๆ

ได้มีรายงานไว้ว่า แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* สาเหตุโรคพืชทุกชนิดสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ (Rudolph,1993) โดยคุณสมบัติของสารแซนแทนจะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์แบคทีเรีย นอกจากนี้ Kovacs (1973) ได้สรุปและรวบรวมไว้ว่า สารแซนแทนกัม เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียสาหตุโรคพืชสกุล *Xanthomonas* หลายชนิด ได้แก่ *X. begoniae, X. malvacearum, X. carotae, X. incanae, X. phaseoli, X. vesicatoria, X. papavericota, X. translucens, X. vasculorum, X. hedrae, X. campestris* โดยพบว่า *X. campestris* เป็นสกุลที่สามารถผลิตสารแซนแทนกัมที่มีคุณภาพดีที่สุด

การศึกษาค้นคว้าวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่เก็บรวบรวมไว้เป็นจำนวนมากในหน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช นำมาศึกษาการสร้างสารแซนแทนกัม เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในสร้างสารแซนแทนกัม และมีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้พัฒนาการผลิตสารแซนแทนกัมภายในประเทศ เป็นเชิงพาณิชย์โดยใช้วัตถุดิบที่มีอยู่ในประเทศไทย เพื่อทดแทนการนำเข้าในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* 15 ไอโซเลต
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Sucrose Agar (PSA) หรือ Wakimoto's Agar ,Potato Sucrose broth (PSB)
3. เอทธิลแอลกอฮอล์ 95%
4. โพแตสเซียมคลอไรด์
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ,เครื่องเขย่า, ตู้อบ เครื่องกวน และอุปกรณ์เครื่องแก้ว

วิธีการ

1. แบบและวิธีการทดลอง
   - แผนการทดลอง CRD
   - กรรมวิธี 15 กรรมวิธี

2. วิธีปฏิบัติการทดลอง

2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย : ย้ายเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เก็บไว้ในอาหารแห้ง (freez dry) เลี้ยงบนอาหาร PSA ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมหัวเชื้อ: เพาะเชื้อแบคทีเรีย (จากข้อ 2.1) จำนวน 1 loop มาตรฐาน ลงบนอาหารเหลว Wakimoto's broth 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตสารแซนแทนกัม : ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย (จากข้อ 2.2) ลงในอาหารเหลวชนิดเดิม โดยใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มเชื้อในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.4 การสกัดและการตกตะกอนสารแซนแทนกัม : นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้จากข้อ 2.3 ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมด้วยสารโพแตสเ ซียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปสกัดแซนแทนกัมออกจากอาหารเหลว โดยเติมเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% อัตราส่วนอาหารเหลว:เอทธิลแอลกอฮอล์ 1:3 โดยปริมาตร กรองด้วยกระดาษกรอง หรือผ้าขาวบางนึ่งฆ่าเชื้อจะได้สารแซนแทนกัมมีลักษณะเหนียวเป็นเส้นสายคล้ายวุ้นแขวนลอยในอาหารเหลว

2.5 การหาน้ำหนักของสารแซนแทนกัม : นำสารแซนแทนกัมที่ได้ไปชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การหาน้ำหนักแห้งปฏิบัติโดยนำแซนแทนกัมไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หรือจนสารแซนแทนกัมแห้งและมีน้ำหนักคงที่

การบันทึกข้อมูล: บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย *Xanthomonas* ในแต่ละสายพันธุ์

2.6 การทดสอบการละลายของสารแซนแทนกัม: นำสารแซนแทนกัมที่บดละเอียด ไปละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ อุณหภูมิน้ำ 23 องศาเซลเซียส โดยชั่งสารแซนแทนกัม 0.1 กรัมละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 100 มิลลิลิตร คนตลอดเวลาเป็นเวลา 5 นาที และตั้งทิ้งไว้ในสภาพอุณหภูมิห้อง (25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับสารแซนแทนกัมที่ผลิตเป็นการค้า ตรวจผลโดยให้เป็นเปอร์เซ็นต์การละลาย

เวลาและสถานที่

เวลา : เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2544 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดสอบสายพันธุ์แบคทีเรีย *Xanthomonas* สาเหตุโรคพืชในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ในการสร้างสารแซนแทนกัม จำนวน 15 ไอโซเลตโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Wakimoto's broth สูตรมาตรฐานพบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ (ตารางที่ 1) โดยเกือบทุกไอโซเลตจะสร้างสารแซนแทนกัมที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน คือมีลักษณะเป็นเส้นสาย คล้ายวุ้นสีขาวขุ่นจนถึงสีเหลืองอ่อนแขวนลอยในอาหารเหลว สามารถใช้แท่งแก้วม้วนพันเก็บผลิตภัณฑ์ขึ้นมาเป็นก้อนได้โดยง่าย ยกเว้นไอโซเลต CM92-013 (*X.c*.pv.*glycines*) สาหตุโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง, *X.c*.pv.*vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดมะเขือเทศและไอโซเลต 1057 (*X.c*.pv.*diffenbachiae*) สาเหตุโรคใบไหม้ในหน้าวัว สร้างปริมาณน้อย ตะกอนละเอียดไม่เหนียวไม่จับตัวเป็นก้อนแขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว ไม่สามารถใช้แท่งแก้วม้วนพันขึ้นมาได้ ต้องใช้กระดาษกรอง กรองเพื่อเก็บผลผลิต (ตารางที่ 2) โดยพบว่า ไอโซเลต 1101 (*X.c*.pv.*campestris*) ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าดำในกะหล่ำดอกที่เก็บรวบรวมได้จากกิ่งอำเภอควนเนียง จังหวัดสงขลา สามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุด โดยให้ผลิตภัณฑ์สดมีลักษณะเป็นเส้นสายสีขาวขุ่นคล้ายวุ้นแขวนลอยในอาหารเหลว สามารถใช้แท่งแก้วจับพันกันเป็นก้อนได้โดยง่าย มีน้ำหนักสดเท่ากับ 11.84กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร เมื่อนำไปอบจนน้ำหนักคงที่ จะได้สารแซนแทนกัมที่มีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีขาวออกครีมบดง่ายเมื่อละเอียดจะเป็นผงสีครีมปนเหลืองเล็กน้อยซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับสารแซนแทนกัมที่จำหน่ายเป็นการค้าที่ใช้ในห้องปฏิบัติการชื่อ Fluka (ตารางที่ 4) โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.77 กรัม (ตารางที่ 1) สำหรับแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสารแซนแทนกัมรองลงมา ได้แก่ แบคทีเรีย *X.c*.pv. *glycines* สาเหตุโรคใบจุดนูนของถั่วเหลือง ซึ่งเก็บรวบรวมจากจังหวัดสุโขทัย สามารถสร้างสารแซนแทนกัมที่มีน้ำหนักสดเท่ากับ 4.68 กรัมต่ออาหารเหลว100 มิลลิลิตรและมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.35 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 1) โดยผลิตภัณฑ์สดมีสีขาวขุ่นปนครีม มีลักษณะใกล้เคียงกับไอโซเลต 1101 แต่เมื่ออบและบดจนเป็นผลิตภัณฑ์แห้งจะให้สารแซนแทนกัมที่มีสีเหลืองอ่อน

นอกจากนี้พบว่า *X. campestris* pathovar เดียวกันซึ่งเป็นสาเหตุโรคบนพืชชนิดเดียวกันแต่จะสร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณที่ต่างกัน เช่น *X. c.* pv. *glycines* ไอโซเลต ST92-063 สร้างสารแซนกัมปริมาณสูงกว่าและไอโซเลต CM92-013 หรือ *X.c*.pv.*betticola* ไอโซเลต 1059 สร้างสารแซนกัมปริมาณสูงกว่าไอโซเลต 1062 เป็นต้น

เมื่อเปรียบเทียบสีและความสามารถการละลายในน้ำกลั่นของสารแซนแทนกัมบดละเอียดกับสารแซนแทนกัมที่ผลิตเป็นการค้าซึ่งใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Super NG^{R}) พบว่า สารแซนแทนกัมที่สร้างโดยแบคทีเรียไอโซเลต TB0004,1487 และ 1185 จะมีสีที่ใกล้เคียงกับ Super NG^{R} ที่สุด โดยไอโซเลต 1487 สามารถละลายในน้ำกลั่นได้ดีเท่ากับ Super NG^{R} คือสามารถละลายได้ 85% ภายในเวลา 5 นาที เมื่อตั้งทิ้งไว้ 5 ชั่วโมงในสภาพอุณหภูมิห้อง (25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) พบว่าสารแซนแทนกัมที่สร้างโดยไอโซเลต

1101, 920, TB0028 และ 1185 สามารถละลายในน้ำกลั่นได้ 100% โดยที่ Super NG^{R} และ Fluka ^{R}สามารถละลายในน้ำกลั่นได้ 85% และ 75% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองพบว่าสอดคล้องกับรายงานของ Rudolph (1993) ซึ่งระบุว่าแบคทีเรียกลุ่ม Xanthomonads ที่เป็นสาเหตุโรคพืชทุกชนิดสามารถสร้างสารเอ็กซ์ตร้าเซลลูลาร์โพลีแซคคาไรด์ ที่เรียกว่า xanthan และ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kovacs (1973) ซึ่งรายงานไว้ว่าสารแซนแทนกัม เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรียสาหตุโรคพืชสกุล *Xanthomonas* หลายชนิด โดยพบว่า *X. campestris* เป็นสกุลที่สามารถผลิตสารแซนแทนกัมที่มีคุณภาพดีที่สุด

ตารางที่ 1 ปริมาณสารแซนแทนกัมที่สกัดจากแบคทีเรีย X*anthomonas* 15 ไอโซเลต โดยคิดเป็นน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง

ไอโซเลตแบคทีเรีย	**น้ำหนักสด (กรัม)**	**น้ำหนักแห้ง (กรัม)**
1101	11.850 a[1/]	0.778 a[1/]
ST92-063	4.675 b	0.346 b
920	1.250 def	0.339 b
TB004	1.425 cde	0.333 b
1487	1.600 cd	0.310 bc
888-2	2.275 c	0.294 bcd
TB0028	1.300 def	0.289 bcd
1185	1.650 cd	0.194 cde
X.c.pv.*vesicatoria*	1.325 def	0.177 def
1059	0.925 defg	0.112 efg
1058-2	0.400 fg	0.106 efg
1062	0.250 g	0.106 efg
CM92-013	0.625 efg	0.078 efg
1058	0.425 fg	0.061 fg
1057	0.125 g	0.054 g
CV (%) =	29.21	31.64

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของสารแซนแทนกัมที่สร้างจากแบคทีเรีย *Xanthomonas* 15 ไอโซเลต ในสภาพผลิตภัณฑ์สด และผลิตภัณฑ์อบแห้ง

ไอโซเลตแบคทีเรีย	ลักษณะทางกายภาพ ของผลิตภัณฑ์สด	ลักษณะทางกายภาพ ของผลิตภัณฑ์อบแห้ง
1101	ตะกอนเหนียวคล้ายวุ้น เป็นเส้นสายยาว สีขาวใส แขวนลอย ในอาหารเหลว เมื่อใช้แท่งแก้วคน จะจับตัวเป็นก้อนโดยง่าย สร้างปริมาณมาก สามารถม้วนพันติดแท่งแก้ว	เป็นก้อนแข็งสีขาวออกครีม บดง่ายเมื่อละเอียดจะเป็นผงสีครีมปนเหลือง
ST92-063	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 1101 แต่สีของตะกอนเป็นขาวขุ่นปนครีมเล็กน้อย	ก้อนแข็งสีครีม เมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลืองอ่อน
920	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 1101 แต่มีลักษณะสีขาวขุ่นปนสีเหลืองอ่อน	เป็นก้อนสีขาวอมเหลือง เมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลืองอ่อน
TB0004	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 1101	เป็นก้อนแข็งสีครีม เมื่อบดละเอียดให้ผงสีขาวครีม
1487	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 1101	เป็นก้อนสีครีม เมื่อบดให้ละเอียดให้ผงสีขาวครีม
888-2	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 1101 แต่มีสีเหลืองอ่อน	เป็นก้อนแข็งสีครีมอมเหลือง เมื่อบดให้ผงละเอียดสีครีมอมเหลือง
TB0028	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 920	เป็นก้อนแข็งสีเหลืองอ่อนเมื่อบดละเอียดให้ผงสีขาวอมเหลือง
1185	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต1101	เป็นก้อนแข็งสีครีม เมื่อบดละเอียดให้ผงสีขาวครีม
X.c.pv.*vesicatoria*	ตะกอนมีลักษณะละเอียด ไม่เหนียว ไม่จับตัวเป็นก้อน มีสีขาวขุ่น แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว ไม่จับตัวเป็นก้อน ต้องใช้กระดาษกรองกรองเพื่อเก็บผลผลิต	เป็นก้อนแข็งสีครีมปนเหลือง เมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลือง
1059	ตะกอนเหนียวคล้ายวุ้นเป็นเส้นสายยาว สีเหลืองอ่อน แขวนลอยในอาหารเหลว เมื่อใช้แท่งแก้วคน จะจับตัวเป็นก้อนโดยง่าย สามารถม้วนพันติดแท่งแก้วได้	เป็นก้อนแข็งสีเหลืองอ่อน เมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลตแบคทีเรีย	ลักษณะทางกายภาพ ของผลิตภัณฑ์สด	ลักษณะทางกายภาพ ของผลิตภัณฑ์อบแห้ง
1058-2	ตะกอนเหนียวคล้ายวุ้นสีขาวแกมเหลือง สร้างปริมาณน้อย จับตัวเป็นก้อนเล็กน้อย	เป็นก้อนแข็งสีเหลืองเมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลือง
1062	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 1059	เป็นก้อนแข็งสีครีมอมเหลือง เมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลืองอ่อน
CM92-013	ตะกอนมีลักษณะละเอียด ไม่เหนียว สร้างปริมาณน้อย คล้ายวุ้นใส สีขาว แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว ไม่จับตัวเป็นก้อน ต้องใช้กระดาษกรองกรองเพื่อเก็บผลผลิต	เป็นก้อนแข็งสีเหลือง เมื่อบดละเอียดจะให้ผงสีเหลืองอ่อน
1058	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 920	มีลักษณะเช่นเดียวกับไอโซเลต 920 ผงละเอียดมีสีเหลืองอ่อน
1057	ตะกอนมีลักษณะละเอียด ไม่เหนียว ไม่จับตัวเป็นก้อน มีสีขาวอมเหลือง แขวนลอยอยู่ในอาหารเหลว ไม่จับตัวเป็นก้อน ต้องใช้กระดาษกรองกรองเพื่อเก็บผลผลิต	เป็นก้อนสีเหลือง เมื่อบดละเอียดให้ผงสีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบสีและการละลายของผลิตภัณฑ์อบแห้งบดละเอียดของสารแซนแทนกัมที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ทั้ง 15 ไอโซเลต กับสารแซนแทนกัมที่ผลิตเป็นการค้า

ไอโซเลต/ผลิตภัณฑ์การค้า	**สี**	**การละลาย (5 นาที) (%)**	**การละลาย (5 ชั่วโมง) (%)**
Fluka®	ครีมปนเหลือง	75	75
Super NG®	ขาวครีม	85	85
1101	ครีมปนเหลือง	80	100
ST92-063	เหลืองอ่อน	65	70
920	เหลืองอ่อน	85	100
TB0004	ขาวครีม	80	90
1487	ขาวครีม	85	95
888-2	เหลือง	65	70
TB0028	เหลือง	80	100
1185	ขาวครีม	80	100
X.c.pv.*vesicatoria*	เหลือง	85	90
1059	เหลืองอ่อน	70	70
1058-2	เหลือง	70	75
1062	เหลืองอ่อน	80	80
CM92-013	เหลืองอ่อน	85	90
1058	เหลืองอ่อน	70	70
1057	เหลืองอ่อน	85	90

ตารางที่ 4 แสดงชื่อเชื้อแบคทีเรีย พืชอาศัย แหล่งของเชื้อและเวลาที่เก็บรวบรวมของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas* ทั้ง 15 ไอโซเลต

ไอโซเลตแบคทีเรีย	ชื่อเชื้อ	โรค/พืชอาศัย	แหล่งเก็บ	ปีที่เก็บรวบรวม
1101	*X.c.*pv.*campestris*	เน่าดำ/กะหล่ำดอก	จ.สงขลา	2534
ST92-063	*X.c.*pv.*glycines*	ใบจุดนูน/ถั่วเหลือง	จ.สุโขทัย	2535
920	*X.c.*pv.*citri*	แคงเกอร์/มะนาวไทย	จ.จันทบุรี	2532
TB0004	*X.c.*pv.*oryzae*	ขอบใบแห้ง/ข้าว	จ.บุรีรัมย์	2543
1487	*X.c.*pv.*manihotis*	ใบไหม้/มันสำปะหลัง	จ.ขอนแก่น	2541
888-2	*X.c.*pv.*citri*	แคงเกอร์/มะกรูด	จ.พิษณุโลก	2532
TB0028	*X.c.*pv.*oryzae*	ขอบใบแห้ง/ข้าว	จ.อำนาจเจริญ	2543
1185	*X.c.*pv.*campestris*	ใบไหม้/คื่นฉ่าย	จ.กาญจนบุรี	2535
*X.c.*pv.*vesicatoria*	*X.c.*pv.*vesicatoria*	ใบจุด/มะเขือเทศ	-[1/]	-[1/]
1059	*X.c.*pv.*betticola*	ใบจุด/พลู	กรุงเทพฯ	2534
1058-2	*X.c.*pv.*diffenbachiae*	ใบไหม้/หน้าวัว	กรุงเทพฯ	2534
1062	*X.c.*pv.*betticola*	ใบจุด/พลู	จ.ราชบุรี	2534
CM92-013	*X.c.glycines*	ใบจุดนูน/ถั่วเหลือง	จ.เชียงใหม่	2535
1058	*X.c.*pv.*citri*	แคงเกอร์/มะนาว	จ.สงขลา	2534
1057	*X.c.*pv.*diffenbachiae*	ใบไหม้/หน้าวัว	กรุงเทพฯ	2534

[1/] ไม่มีการบันทึกวันเวลาและสถานที่เก็บรวบรวม

สรุปผลการทดลอง

ผลการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* สาเหตุโรคพืช 15 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลต สามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ โดยมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันแต่มีปริมาณแตกต่างกันไป และผลิตภัณฑ์สดจะมีลักษณะคล้ายวุ้นสีขาวขุ่นจนถึงสีเหลืองอ่อนโดย ไอโซเลต 1011 (*X.c.* pv.*campestris*) สามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุดและมีลักษณะทางกายภาพใกล้เคียงกับสารแซนแทนกัมที่วางจำหน่ายในท้องตลาด และไอโซเลต 1487 (*X.c.* pv.*manihotis*) มีลักษณะสีและความสามารถการละลาย

ในน้ำกลั่นได้ใกล้เคียงกับสารแซนแทนกัมที่ใช้ในอุตสาหกรรม และพบว่า *X.c.* pathovar เดียวกันแต่ไอโซเลตต่างกันจะมีการสร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณที่ต่างกัน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณนงรัตน์ นิลพานิชย์ สถาบันวิจัยข้าวและคุณขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ ที่กรุณาให้เชื้อแบคทีเรียบางไอโซเลตในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ภาวิณี โลหะนะ. 2524. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของแซนแทนกัม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร โชติศศิธร. 2536. การผลิตแซนแทนกัมด้วยเครื่องชีวปฏิกรณ์แบบฟองอากาศจากสายพันธุ์คัดเลือก *Xanthomonas campestris*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Kovacs, P. 1973. Xanthan gum, a new and unique colloidal stabilizer for the British Food Industry. Food Trade Review 43: 17-22.

Leach,J.G., V.G.Lilly,H.A.Wilson and M.R.Purvis.1957. BacterialPolysaccharides: The nature and function of the exudates produced by *Xanthomonas phaseoli*. Phytopathology 47:113-120.

Lilly, V.G., H.A.Wilson and J.E.Leach. 1958. Bacterial polysaccharide. Part II. Laboratory scale production of polysacchride by species of *Xanthomonas*. Appl. Microbiol. 6: 105-108.

Rogovin, S.P.,R.F.Anderson and M.C.Cadmus. 1961. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. J.biochem.Microbiolo.Technol. 3: 51-63

Rudolph,K. 1993. Infection of the plant by *Xanthomonas*. *In* Xanthomonas. (eds.) Chapman & Hall, London.

_____(http://www.helios.bto.ed.aac.uk/bto/microbes/xanthan.htm)

การพัฒนาสูตรอาหาร Wakimotoที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas*

Modification of Wakimoto's Medium for High Xanthangum Production of *Xanthomonas* spp.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ **ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย *X.c.* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ ในอาหาร Wakimoto's broth สูตรต่างๆ ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Wakimoto's broth ซึ่งมีการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราของน้ำตาล เปบโตน และ แอมโมเนียมไนเตรทต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร ดังนี้ น้ำตาลซูโคลส 5,10,20,30 และ 40 กรัม, น้ำตาลกลูโคลส 5,10,20,30 และ 40 กรัม , เปบโตน 1,3,5 และ 7 กรัมและแอมโมเนียมไนเตรท 0.1,0.3,0.5 และ0.7 กรัม พบว่าแบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Wakimoto's broth สูตรมาตรฐานที่มีน้ำตาลซูโคลส 20 กรัม เปบโตน 5 กรัม มันฝรั่ง 300 กรัม แคลเซียมไนเตรต {$(Ca(Na_3)_2 4H_2O$} 0.5 กรัม และ di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 12H_2O$) 2 กรัม เป็นองค์ประกอบของอาหาร 1,000 มิลลิลิตร โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมเท่ากับ11.83 กรัม และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มล. ตามลำดับ

รหัสทะเบียนวิจัย 45 11004 002

คำนำ

การสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรียนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆที่ เกี่ยวข้องต่อการบ่มเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุด เนื่องจากมีรายงานว่าปริมาณและคุณสมบัติในการสร้างสารแซนแทนกัมจะแตกต่างกันไป นอกจากจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายพันธุ์แบคทีเรียแล้ว ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ก็มีความสำคัญมากต่อปริมาณการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย เช่นกัน ทั้งนี้มีรายงานว่าLilly และคณะ (1958) ได้ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *X. phaseoli* และ *X. campestris* พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสอยู่ในช่วง 1-5 %จะได้สารแซนแทนกัมปริมาณมากที่สุด

นอกจากนี้ ภาวิณี (2524) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแซนแทนกัม โดยได้ทำการศึกษาการผลิตสารแซนแทนกัมจากเชื้อ *X. campestris* 12 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ 03 ผลิตแซนแทนกัมได้สูงสุด 0.599% โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อผลิตแซนแทนกัม ประกอบด้วย น้ำตาลทราย 2.5% , แอมโมเนียมไนเตรท 0.06% , ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟท 0.5% แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรท 0.01% และมี pH เริ่มต้น 7.4 สภาวะที่เหมาะสมใช้ Inoculum 10% วิธีการสกัดที่เหมาะสมโดยนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาเติมด้วยโปตัสเซียมคลอไรด์ 1% ตกตะกอนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ส่วนโดยปริมาตร

ทั้งนี้ Lawrence (1976) ได้สรุปขั้นตอนการผลิตสารแซนแทนกัมจาก *Xanthomonas campestris* เป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นที่ 1 ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็งลงในอาหารเหลวที่มีกลูโคส ในสภาพมีอากาศตลอดเวลา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขั้นที่ 2 นำสารละลายที่ได้มาใส่ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 3% ปริมาตรเป็น 9 เท่า ขั้นที่ 3 ขั้นตอนของการหมัก ใช้อาหารเหลว 19 เท่า หมักเป็นเวลา 19 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดสารแซนแทนกัมด้วยแอลกอฮอล์

ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยเฉพาะชนิดและอัตรของสารที่เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่ง ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย *X.c.* pv. *campestris* ทั้งนี้ บุษราคัมและคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล Xanthomonas สาเหตุโรคพืชเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างสารแซนแทนกัม พบว่า *X.c.* pv. *campestris* สาเหตุโรคเน่าดำในกะหล่ำดอก ไอโซเลต 1101 สามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูง แต่ยังไม่มีการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียสร้างสารแซนแทนกัมที่มีปริมาณสูงสุด งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราของน้ำตาลและเปบโตนซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหาร Wakimoto’s broth เพื่อให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อสร้างสารแซนแทนกัมให้ได้ปริมาณสูงสุดและได้สารแซนแทนกัมที่มีคุณสมบัติดีเหมาะสม

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย *X.c.* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101
2. อาหาร Wakimoto's broth
3. น้ำตาลซูโคส,กูลโคส
4. สารเคมีได้แก่ โพแตสเซียมคลอไรด์, แอมโมเนียมไนเตรท,เปบโตน
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ,เครื่องเขย่า , ตู้อบ ,เครื่องกวน และอุปกรณ์เครื่องแก้ว

วิธีการทดลอง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

แบบและวิธีการทดลอง

- แผนการทดลอง CRD
- กรรมวิธี 10 และ 8 กรรมวิธี ตามลำดับ

1. ศึกษาชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัม

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X.c.* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101 เลี้ยงบนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาเตรียมหัวเชื้อบนอาหาร Wakimoto's broth เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว Wakimoto's broth โดยเปลี่ยนชนิดและปริมาณของน้ำตาลดังต่อไปนี้

S-5 = น้ำตาลซูโคส 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
S-10 = น้ำตาลซูโคส 10 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
S- 20 = น้ำตาลซูโคส 20 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
S-30 = น้ำตาลซูโคส 30 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
S-40 = น้ำตาลซูโคส 40 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
G-5 = น้ำตาลกูลโคส 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
G-10 = น้ำตาลกูลโคส 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
G-20 = น้ำตาลกูลโคส 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
G-30 = น้ำตาลกูลโคส 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร
G-40 = น้ำตาลกูลโคส 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาสกัดสารแซนแทนกัม และตกตะกอนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% กรองด้วยกระดาษกรอง

หรือผ้าขาวบางนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัม การหาน้ำหนักแห้งปฏิบัติโดยนำแซนแทนกัมไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หรือจนสารแซนแทนกัมแห้งและมีน้ำหนักคงที่

การบันทึกข้อมูล : บันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัม

2. ศึกษาปริมาณและอัตราของเปบโตนและ/หรือแอมโมเนียมไนเตรท ที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัม

เตรียมเชื้อและหัวเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 1 หลังจากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่ได้ลงในอาหาร Wakimoto's broth โดยเปลี่ยนชนิดและปริมาณของสารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนดังนี้

P-1 = เปบโตน 1 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

P-3 = เปบโตน 3 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

P-5 = เปบโตน 5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

P-7 = เปบโตน 7 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

A-1 = แอมโมเนียมไนเตรท 0.1 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

A-3 = แอมโมเนียมไนเตรท 0.3 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

A-5 = แอมโมเนียมไนเตรท 0.5 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

A-7 = แอมโมเนียมไนเตรท 0.7 กรัมต่ออาหารเหลว 1,000 มิลลิลิตร

นำมาสกัดสารแซนแทนกัม และตกตะกอนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% นำไปหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัม การหาน้ำหนักแห้งปฏิบัติเช่นเดียวกับ การทดลองที่ 1

การบันทึกข้อมูล : บันทึกน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัม

เวลาและสถานที่

เวลา : เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2544 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X.c.* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ ในอาหาร Wakimoto's broth สูตรต่างๆ โดยการเปลี่ยนชนิดและอัตราของน้ำตาล พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Wakimoto's broth สูตรมาตรฐาน ซึ่งใช้น้ำตาลซูโคลส อัตรา 20 กรัมต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตรเป็นองค์ระกอบ แบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุดโดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ และการสร้างจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโคลสขึ้น รองลงมาได้แก่เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหาร Wakimoto's broth ที่ใช้น้ำตาลกลูโคลส 40 กรัมต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตรเป็นองค์ประกอบ ซึ่งแบคทีเรียทดสอบสร้างสารแซนแทนกัมโดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.80 และ 0.54 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคลส ในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณการสร้างสารแซนแทนกัมจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ในการทดสอบการเปลี่ยนเปบโตนและแอมโมเนียมไนเตรทอัตราต่างๆ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหาร Wakimoto's broth สูตรมาตรฐาน ซึ่งมีเปบโตน 5 กรัม เป็นองค์ประกอบของอาหาร 1,000 มิลลิลิตร แบคทีเรียจะสร้างสารแซนแทนกัมได้ในปริมาณสูงสุดโดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมาได้แก่เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหาร Wakimoto's broth ที่ใช้เปบโตน 3 กรัม ซึ่งแบคทีเรียทดสอบจะสร้างสารแซนแทนกัมโดยคิดเป็นน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.67 และ 0.51 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณสารแซนแทนกัมที่สกัดจากแบคทีเรีย X*anthomonas campestris* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Wakimoto's broth โดยปรับเปลี่ยนชนิดน้ำตาล อัตราต่างๆ

ชนิด/อัตราน้ำตาล	**น้ำหนักสด (กรัม)**	**น้ำหนักแห้ง (กรัม)**
S-5	1.59 e[2/]	0.25 de[2/]
S-10	2.74 cd	0.36 cd
S-20[1/]	11.55 a	0.78 a
S-30	2.61 cd	0.31 d
S-40	2.59 cd	0.37 cd
G-5	1.35 e	0.17 e
G-10	1.77 de	0.26 de
G-20	2.15 de	0.32 d
G-30	3.34 bc	0.47 bc
G-40	3.80 b	0.54 b
CV (%) =	39.00	39.00

[1/] ปริมาณน้ำตาลซูโครลส อัตรา 20 กรัม เป็นองค์ประกอบของอาหาร Wakimoto's broth สูตรมาตรฐาน

[2/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ตารางที่ 2 ปริมาณสารแซนแทนกัมที่สกัดจากแบคทีเรีย X*anthomonas campestris* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101 เมื่อเลี้ยงในอาหาร Wakimoto's broth โดยปรับเปลี่ยนเป็นเปบโตนและแอมโมเนียมไนเตรทอัตราต่างๆ

อัตราเปบโตน/แอมโมเนียมไนเตรท	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
P-1	2.56 d	0.26 e
P-3	6.67 b[2/]	0.51 bcd[2/]
P-5[1/]	11.84 a	0.78 a
P-7	3.53 cd	0.40 cde
A-1	3.66 cd	0.53 bc
A-3	4.07 c	0.60 b
A-5	3.56 cd	0.45 bcd
A-7	2.57 d	0.33 de
CV (%) =	31.00	31.00

[1/] ปริมาณเปบโตน อัตรา 5 กรัม เป็นองค์ประกอบของอาหาร Wakimoto's broth สูตรมาตรฐาน

[2/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย *X.c.* pv.*campestris* ไอโซเลต 1101 โดยเลี้ยงในอาหาร Wakimoto's broth ที่มีการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราของน้ำตาลและเปบโตนพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร Wakimoto's broth สูตรมาตรฐานคือ มีน้ำตาลซูโคลส 20 กรัม เปบโตน 5 กรัม มันฝรั่ง 300 กรัม แคลเซียมไนเตรต $\{(Ca(Na_3)_2 4H_2O\}$ 0.5 กรัม และ di-Sodium hydrogen phosphate ($Na_2HPO_4 12H_2O$) 2 กรัม เป็นองค์ประกอบของอาหาร 1,000 มิลลิลิตร แบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุด โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ . 2548 คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างแซนแทนกัม. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ภาวิณี โลหะนะ. 2524. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของแซนแทนกัม. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Lawrence, A.A. 1976. Xanthomonas hydrophilic colloid. *In* National Gums for Edible Purposes. Noyes Data Corporation (eds). Park Ridge, New Jersey, U.S.A.

Lilly, V.G., H.A.Wilson and J.E.leach. 1958. Bacterial polysaccharide. Part II. Laboratory scale production of polysacchride by species of *Xanthomonas*. Appl. Microbiol. 6: 105-108.

ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการสกัดสารแซนแทนกัมของแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas*

Extraction Techniques Suitable for *Xanthomonas*'s Xanthangum

บุษราคัม อุดมศักดิ์ **ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารแซนแทนกัมของเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. c*ampestris* ไอโซเลต 1101 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่อุณหภูมิ ช่วงเวลา ที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อและปริมาณอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ สร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณสูงสุด ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยเลี้ยงแบคทีเรีย *X. c*. pv. c*ampestris* ไอโซเลต 1101 ซึ่งเป็นสาเหตุโรคเน่าดำ (Black rot) ในผักตระกูลกะหล่ำ ซึ่งเก็บรวบรวมจาก จังหวัดกาญจนบุรี บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ปรับอุณหภูมิ เป็น 19, 22, 25, 28 และ 31 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาในการบ่มเชื้อเป็น 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง และปริมาณอาหาร Wakimoto's broth ปริมาณ 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟาสก์ขนาด250 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที พบว่า เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Wakimoto's broth ปริมาณ 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณสูงสุด โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง เท่ากับ 11.84 และ 0.78 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ

รหัสทะเบียนวิจัย 45 11004 003

คำนำ

สารแซนแทนกัมเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ที่แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* สร้างขึ้นบริเวณผนังเซลล์ ปริมาณและองค์ประกอบของสารแซนแทนกัมจะแตกต่างกันไป นอกจากขึ้นอยู่กับสายพันธุ์แบคทีเรีย (บุษราคัมและคณะ, 2548) องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว (บุษราคัมและคณะ, 2548) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการบ่มเชื้อ เช่น อุณหภูมิ ช่วงเวลา และปริมาณอาหาร ก็มีผลต่อการสร้างสารแซนแทนกัมเช่นกัน โดย Cadmus และคณะ (1978) ได้ทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารแซนแทนกัมในเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* สายพันธุ์ B-1459 เช่น อายุของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพการเก็บ ขนาดโคโลนี จำนวนครั้งในการถ่ายเชื้อ พบว่ามีผลต่อปริมาณและคุณภาพของการสร้างสารแซนแทนกัม

นอกจากนี้ Lilly และคณะ (1958) ได้ทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *X. campestris* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถสร้างสารโพลีแซคคาไรด์หรือสารแซนแทนกัมออกมาภายนอกเซลล์ได้ และได้ศึกษาสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *X. phaseoli* และ *X. campestris* เพื่อให้ได้สารแซนแทนกัมปริมาณมากที่สุด พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์สภาพที่มีอากาศ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1-5 %

ศศิธร (2536) ได้ทำการศึกษาการผลิตสารแซนแทนกัม ของเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* ที่ได้จาก NRRL พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส

ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย *X.c.* pv. *campestris* ทั้งนี้ บุษราคัมและคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยพัฒนาสูตรอาหาร Wakimoto's broth โดยการปรับเปลี่ยนชนิดและอัตราของน้ำตาลและเปบโตนซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหาร Wakimoto's broth เพื่อให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อสร้างสารแซนแทนกัมให้ได้ปริมาณสูงสุด แต่ยังไม่มีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างสารแซนแทนกัม

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *X.c.* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Wakimoto's Agar และ Wakimoto's broth
3. เอทธิลแอลกอฮอล์ 95%
4. โพแตสเซียมคลอไรด์
5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ ,เครื่องเขย่า, ตู้อบ เครื่องกวน และอุปกรณ์เครื่องแก้ว

วิธีการ

1. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัม

วิธีปฏิบัติการทดลอง

แบบและวิธีการทดลอง

- แผนการทดลอง CRD

- กรรมวิธี 5

1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย : ย้ายเชื้อแบคทีเรีย *X.c*.pv. *campestris* ไอโซเลต1101 ที่เลี้ยงไว้ในอาหารแห้ง (freez dry) มาเลี้ยงบนอาหาร Wakimoto's Agar ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง

1.2 การเตรียมหัวเชื้อ : เพาะเชื้อแบคทีเรีย (จากข้อ 1.1) จำนวน 1 loop มาตรฐาน ลงบนอาหารเหลว Wakimoto's broth 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อ ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัม : ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรีย (จากข้อ 1.2) ลงในอาหารเหลวชนิดเดิม โดยใช้หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มเชื้อในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 19, 22, 25, 28 และ31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

1.4 การสกัดและการตกตะกอนสารแซนแทนกัม : นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้จากข้อ 1.3 ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติมด้วยสารโพแตสเซี่ยมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปสกัดแซนแทนกัมออกจากอาหารเหลว โดยเติมเอทธิลแอลกอฮอล์ 95% อัตราส่วนอาหารเหลว:เอทธิลแอลกอฮอล์ 1:3 โดยปริมาตร กรองด้วยกระดาษกรองหรือผ้าขาวบางนึ่งฆ่าเชื้อจะได้สารแซนแทนกัมมีลักษณะเหนียวเป็นเส้นสายคล้ายวุ้นแขวนลอยในอาหารเหลว

1.5 การหาน้ำหนักของสารแซนแทนกัม : นำสารแซนแทนกัมที่ได้ไปชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง การหาน้ำหนักแห้งปฏิบัติโดยนำแซนแทนกัมไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง หรือจนสารแซนแทนกัมแห้งและมีน้ำหนักคงที่

การบันทึกข้อมูล: บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมของแบคทีเรียทดสอบ ในแต่ละอุณหภูมิ

2. การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัม

วิธีปฏิบัติการทดลอง เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และ1. 2 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวชนิดเดิม ในอัตรา 10 % โดยปริมาตรนำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดและตกตะกอนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 1.4 นำไปหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมทุกช่วงเวลา

การบันทึกข้อมูล: บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย ทดสอบในแต่ละช่วงเวลา

3. การศึกษาปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัม

วิธีปฏิบัติการทดลอง เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียโดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.1 และ1. 2 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเหลวชนิดเดิม ในอัตรา 10 % โดยปริมาตรเติมลงในอาหารชนิดเดิมปริมาตรต่างๆ คือ 50, 100, 150, 200 และ 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาสกัดและตกตะกอนด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 1.4 นำไปหาน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมทุกปริมาตรอาหาร

การบันทึกข้อมูล: บันทึกน้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมของแบคทีเรีย ทดสอบในแต่ละปริมาตร

เวลาและสถานที่

เวลา : เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2544 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้สร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณสูงสุด พบว่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *X. c.* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101ซึ่งเป็นแบคทีเรียทดสอบ สามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุด โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมาได้แก่เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียทดสอบสร้างสารแซนแทนกัม มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 3.78 และ 0.51 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 1และ ภาพที่ 1)

การทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อ พบว่า เมื่อบ่มเชื้อถึง 72 ชั่วโมงแบคทีเรียทดสอบจะสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุดโดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ และปริมาณการสร้างสารแซนแทนกัมจะค่อยๆลดลงเรื่อยๆ เมื่อช่วงเวลาการบ่มเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่ คือ เมื่อเข้าระยะ Log (Log phase) หรือเมื่อเลี้ยงเชื้อ 48-72 ชั่วโมง จะเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการเจริญสูงสุด หลังจากนั้นแบคทีเรียจะหยุดการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ stationary (stationary phase) หรือเมื่อเลยระยะเวลา 72 ชั่วโมง และค่อยๆตายลงเนื่องจากมีการสะสมสารพิษในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการเมตาโบไลท์ (metabolism) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

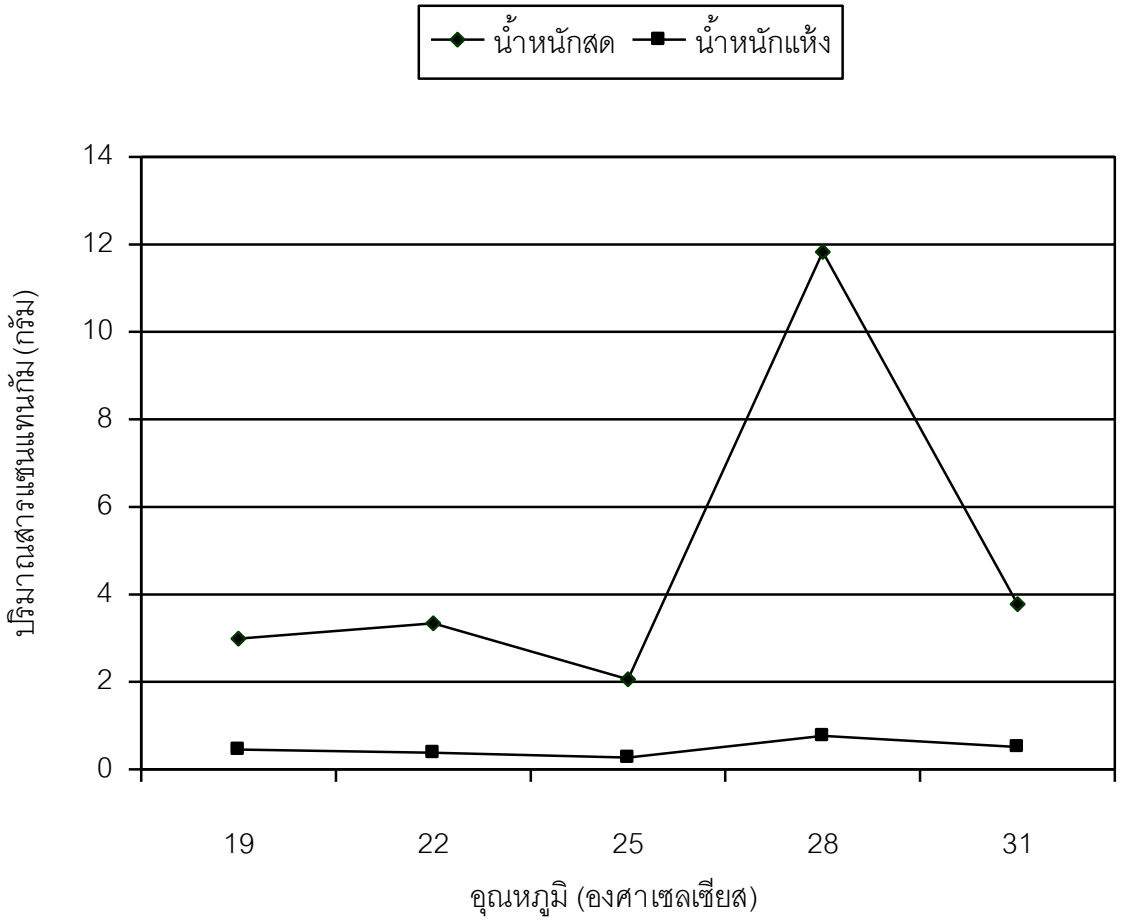
ในการศึกษาปริมาณอาหารที่เหมาะสม พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปริมาณ 100 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แบคทีเรียทดสอบจะสร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณสูงสุดโดยมีน้ำหนักสด

และน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ รองลงมาเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารปริมาณ 200 มิลลิลิตร โดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.44 และ 0.51 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมที่สร้างโดยเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
19	2.994 bc[1/]	0.456 bc[1/]
22	3.346 bc	0.385 bc
25	2.069 c	0.277 c
28	11.839 a	0.778 a
31	3.787 b	0.512 b
CV (%)	18.17	23.51

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

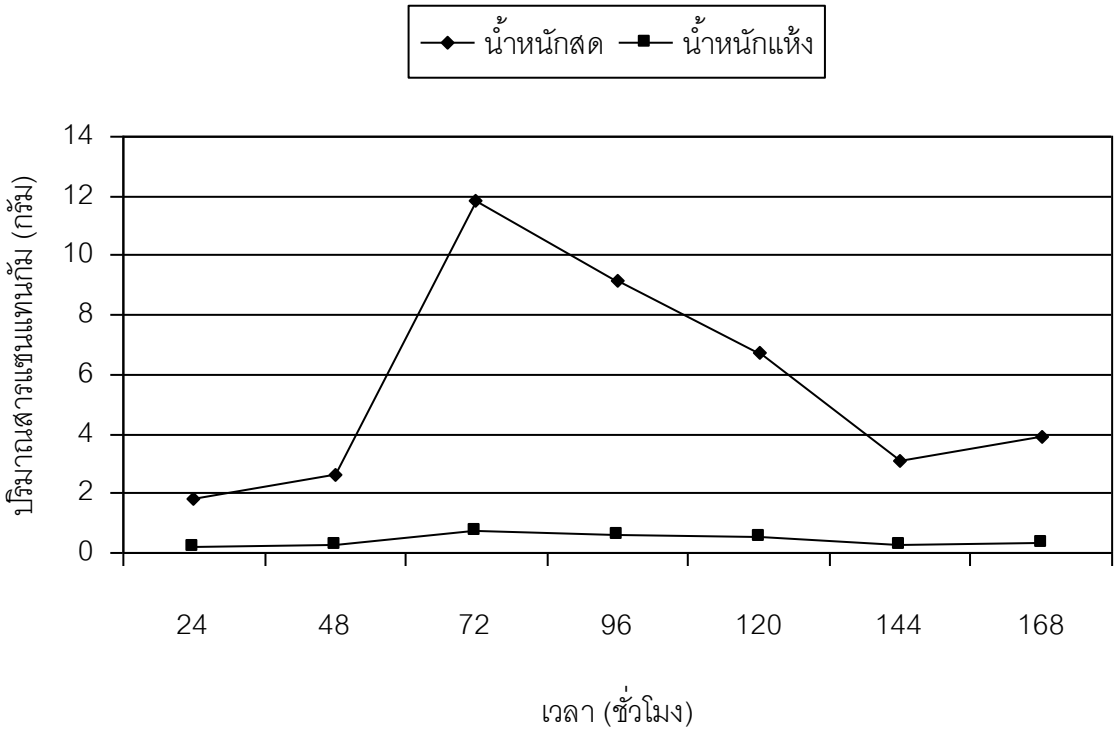


ภาพที่1 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของแซนแทนกัมที่สร้างโดยเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

ตารางที่ 2 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมที่สร้างโดยเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 ในแต่ละช่วงเวลาของการบ่มเชื้อ

ช่วงเวลาของการบ่มเชื้อ (ชั่วโมง)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
24	1.849 e[1/]	0.216 c[1/]
48	2.604 de	0.255 c
72	11.839 a	0.778 a
96	9.169 b	0.613 b
120	6.702 c	0.567 b
144	3.111 de	0.290 c
168	3.908 d	0.341 c
CV (%)	19.26	15.34

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

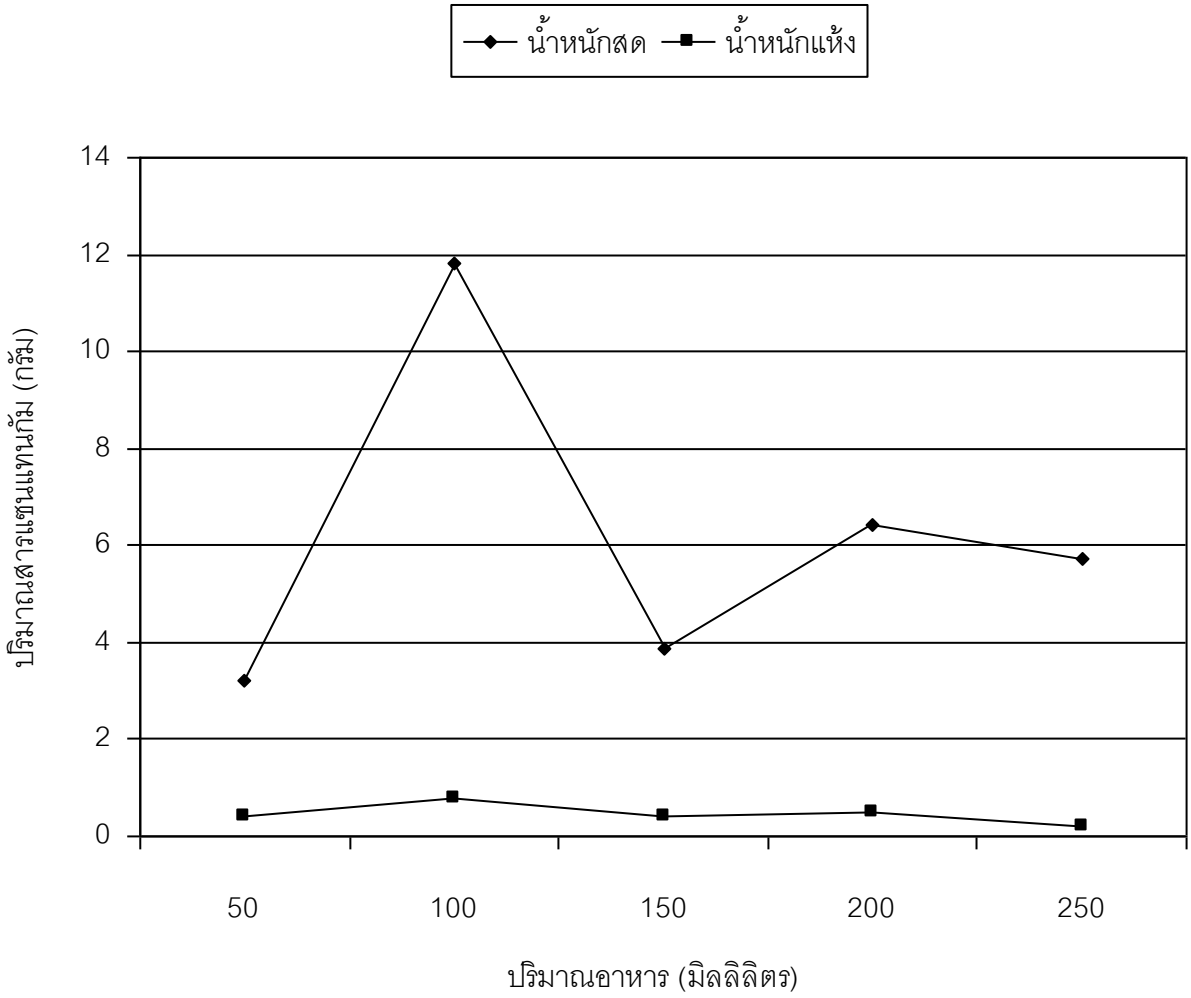


ภาพที่ 2 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมที่สร้างโดยเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 ในแต่ละช่วงเวลาของการบ่มเชื้อ

ตารางที่ 3 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมที่สร้างโดยเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรต่างๆ

ปริมาณอาหาร (มล.)	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
50	3.207 d[1/]	0.411 b[1/]
100	11.839 a	0.778 a
150	3.887 cd	0.408 b
200	6.443 b	0.518 b
250	5.736 bc	0.213 b
CV (%)	22.50	33.49

[1/]ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรตามหลังเหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ภาพที่ 3 แสดงน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของสารแซนแทนกัมที่สร้างโดยเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการสร้างสารแซนแทนกัม ได้แก่อุณหภูมิ ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการบ่มเชื้อแบคทีเรีย และปริมาณอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *X. c.* pv. *campestris* ไอโซเลต 1101 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ เพื่อให้สร้างสารแซนแทนกัมในปริมาณสูงสุด พบว่า การบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Wakimoto's broth ปริมาณ 100 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟาสก์ขนาด250 มิลลิลิตร แบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างสารแซนแทนกัมได้ปริมาณสูงสุดโดยมีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.83 และ 0.77 กรัมต่ออาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ . 2548ก. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างแซนแทนกัม. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2548ข. การพัฒนาสูตรอาหาร Wakimotoที่เหมาะสมในการสร้างสารแซนแทนกัมของแบคทีเรียสกุล *Xanthomonas*. (อยู่ระหว่างการตีพิมพ์)

ศศิธร โชติศศิธร. 2536. การผลิตแซนแทนกัมด้วยเครื่องชีวปฏิกรณ์แบบฟองอากาศจากสายพันธุ์คัดเลือก *Xanthomonas campestris*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , กรุงเทพฯ.

Cadmus, M.C.,C.A.Knutson.,A.A.Lagoda.,J.E.Pittsley and K.A.Burton. 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotech. And Bioeng. 20: 1003-1014.

Lilly, V.G., H.A.Wilson and J.E.leach. 1958. Bacterial polysaccharide. Part II. Laboratory scale production of polysacchride by species of *Xanthomonas*. Appl. Microbiol. 6: 105-108.

การควบคุมไรแดงศัตรูส้มและแมลงปากดูดบางชนิด โดยวิธีการให้น้ำและการใช้ไรตัวห้ำ *Amblyseius longispinosus* (Evans) ในส้มเขียวหวาน

Control of Mite and Some Sucking Insect Pests by Spraying Water and Releasing predatory mite, *Amblyseius longispinosus* (Evans) on Tangerine

มานิตา คงชื่นสิน

วัฒนา จารณศรี **เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

ทำการทดลองในสวนส้มเขียวหวาน(พันธุ์โชกุน) อายุประมาณ 2 ปี ของเกษตรกร อำเภออาคลี จังหวัดนครสวรรค์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2545 - กันยายน 2546 โดยแบ่งสวนส้มออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ 1) สวนพ่นน้ำ โดยติดตั้งหัวฉีดระบบน้ำเหวี่ยงไว้บนเหนือทรงพุ่ม และ 2) สวนไม่พ่นน้ำ สุ่มเก็บตัวอย่างแมลงและไรในแปลงทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยการสุ่มนับจำนวนแมลงศัตรูส้มชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยไก่แจ้ส้ม หนอนชอนใบส้ม หนอนแปะใบส้ม ไรแดงแอฟริกัน ไรเหลืองส้ม ไรสนิมส้ม ไรขาว และบันทึกจำนวนศัตรูธรรมชาติ เช่น ไรตัวห้ำ เพลี้ยไฟตัวห้ำ ด้วงตัวห้ำ ผลการทดลองพบว่าการพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม มีแนวโน้มว่าสามารถช่วยลดประชากรของ เพลี้ยไฟ และไรแดงแอฟริกันได้ แต่พบประชากรของหนอนชอนใบ และหนอนแปะใบมากกว่าแปลงส้มที่ไม่พ่นน้ำ และ การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม มีแนวโน้มทำให้มีการระบาดของไรสนิมส้มเพิ่มขึ้น

คำนำ

แมลงศัตรูส้มแต่ละชนิดที่มีความสำคัญแตกต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งปลูก ในพื้นที่ภาคเหนือตอนบนและล่างของประเทศไทย นิยมปลูกส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนแบบสภาพไร่ ไม่ยกร่องปลูกเหมือนในภาคกลางแถบเขตรังสิต ซึ่งมีพื้นที่เป็นที่ราบ สามารถให้น้ำแบบขังในร่องสวนได้ สวนส้มในบริเวณภาคกลางจึงมีความชุ่มชื้น การปลูกส้มแบบสภาพไร่เหมาะกับพื้นที่บนที่สูง เชิงเขา พื้นที่มีความลาดเอียง แม้ว่าการจัดการด้านเขตกรรมในการเพาะปลูกแบบสภาพไร่ จะทำได้และสะดวกกว่า แต่พบว่ามักจะมีปัญหาการระบาดของศัตรูส้มที่ชอบความแห้งแล้ง เช่น เพลี้ยไฟ ไร เป็นต้น

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 46 06 014 003

แนวทางการแก้ไขปัญหาการระบาดของแมลงจำพวกปากดูด และไรในสวนส้มแบบสภาพไร่ที่เป็นไปได้คือ 1) ใช้วิธีการปรับสภาพแวดล้อมของสวนส้มไม่ให้เหมาะสมที่แมลงและไรระบาด โดยการพ่นน้ำให้ความชื้น 2) อนุรักษ์และปล่อยศัตรูธรรมชาติที่พบว่ามีศักยภาพ เพื่อเพิ่มปริมาณตัวห้ำ ตัวเบียน ให้ช่วยควบคุมแมลงและไรศัตรูส้ม จากรายงานพบว่า ในสภาพที่มีฝนตกหรือสภาพอากาศชื้น ไรศัตรูพืชจะเพิ่มประชากรได้ช้า มีการตายเพิ่มขึ้น แต่ขณะเดียวกันกลับเป็นการเพิ่มศักยภาพการอยู่รอดของประชากรไรตัวห้ำให้มีมากขึ้น

วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาการควบคุมประชากรของแมลงศัตรูส้มประเภทปากดูด เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย และไรศัตรูส้มชนิดต่าง ๆ ในแปลงส้มที่จัดการปรับสภาพแวดล้อมโดยวิธีพ่นน้ำระบบน้ำเหรี่ยงบนยอดของต้นส้มเปรียบเทียบกับแปลงส้มที่ปฏิบัติโดยวิธีการของเกษตรกร เป้าหมายที่คาดว่าจะได้รับ คือ สามารถลดการใช้สารเคมีในสวนส้ม โดยมีทางเลือกใหม่ในการจัดการแมลงและไรศัตรูส้ม เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของเกษตรกรและผู้บริโภค

วิธีดำเนินงาน

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองในสวนส้มเขียวหวาน(พันธุ์โชกุน) อายุประมาณ 2 ปี ระยะปลูก 3 x 5 เมตร มีระบบการให้น้ำและปุ๋ยทางท่อโคนต้น แบ่งสวนส้มออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ 1) สวนพ่นน้ำ และ 2) สวนไม่พ่นน้ำ กั้นสวนทั้งสองด้วยถนนกว้างประมาณ 8 เมตร

1. **สวนที่พ่นน้ำ** ติดตั้งหัวฉีดระบบน้ำเหวี่ยงไว้บนเหนือทรงพุ่ม ให้ความชื้นเพื่อไม่ให้เหมาะสมกับการระบาดของแมลงและไร (ปล่อยน้ำประมาณ 7 ชม. ต่อวัน เริ่มตั้งแต่วันที่ 15 ธันวาคม 2545 ซึ่งเป็นช่วงที่เกษตรกรพบว่าฝนหยุดตกอากาศเริ่มแห้งแล้ง 2 ครั้งในช่วงเช้าและบ่าย) แบ่งเป็นแปลงย่อย 4 แปลงย่อย ๆ ละ 16 ต้น
2. **สวนไม่พ่นน้ำ** เป็นสวนส้มสภาพไร่ปกติที่ไม่มีการพ่นน้ำ แบ่งเป็นแปลงย่อย 4 แปลงย่อย ๆ ละ 16 ต้น

การบันทึกข้อมูล

เริ่มสุ่มเก็บตัวอย่างแมลงและไรในแปลงทดลองในวันที่ 17 ตุลาคม 2545 ทุก 2 สัปดาห์ สำหรับแปลงพ่นน้ำ บันทึกผลการทดลองจากต้นส้มแถวกลางของแปลงย่อย 4 ต้น/แปลงย่อย (5 ยอด/ต้น และ 5 กิ่ง/ต้น) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ โดยการสุ่มนับจำนวนแมลงศัตรูส้มชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยไก่แจ้ส้ม หนอนชอนใบส้ม หนอนแปะใบส้ม โดยมีวิธีตรวจนับดังนี้

1. เพลี้ยไฟ เพลี้ยไก่แจ้ จำนวน 5 ยอดอ่อน/ต้น และ 5 ลูกอ่อน/ต้น
2. เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย จำนวน 5 ยอดอ่อน/ต้น และ 5 ลูกอ่อน/ต้น
3. หนอนชอนใบ หนอนแปะใบ จำนวน 5 ยอด/ต้น

ส่วนการสุ่มไรศัตรูพืชใช้วิธีสุ่มเก็บใบแก่ 5 ใบ/ต้น(20ใบ/แปลงย่อย) รอบทรงพุ่มใส่ถุงพลาสติก แช่เย็น แล้วนำกลับไปตรวจนับไรใต้กล้อง stereo- microscope บันทึกจำนวนไรแดงแอฟริกัน ไรเหลืองส้ม

สำหรับไรสนิมส้ม สำรวจจาก 5 ลูกอ่อน/ต้น และบันทึกจำนวนศัตรูธรรมชาติ เช่น ไรตัวห้ำ เพลี้ยไฟตัวห้ำ ด้วงตัวห้ำ ที่พบบนต้นส้มด้วย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2545 - กันยายน 2546

สถานที่ 1. สวนส้มของเกษตรกร อ.ตาคลี จ.นครสวรรค์

2. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ระยะ ตามวิธีการพ่นน้ำ คือ

1. ช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546
2. ช่วงเดือนมีนาคม 2546 ถึง สิงหาคม 2546

ผลการเปรียบเทียบจำนวนแมลงและไรในแปลงส้มที่พ่นน้ำและไม่พ่นน้ำ ช่วงที่ 1

ผลการสำรวจ 10 ครั้ง ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ในแปลงทดลองช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546 พบว่ากลุ่มแมลงปากดูด และแมลงศัตรูอื่นที่สำคัญ 3 ชนิด คือ เพลี้ยไฟ หนอนชอนใบ หนอนแปะใบ และพบไรศัตรูพืช 3 ชนิด คือ ไรแดงแอฟริกัน ไรเหลืองส้ม และไรสนิมส้ม รวมทั้งพบไรตัวห้ำ 1 ชนิด

จากการสำรวจ พบว่า จำนวนแมลงที่สำคัญที่พบในแปลงพ่นน้ำ (พ่นน้ำประมาณ 7 ชม. ต่อวัน)และไม่พ่นน้ำ มีค่าเฉลี่ยแสดงไว้ในตารางที่ 1 และ 2

เพลี้ยไฟ พบมากในช่วงเวลาที่ส้มแทงช่อดอก (ช่วงเดือน พฤศจิกายน – มกราคม และปลายเดือนกุมภาพันธ์) จำนวนที่พบสอดคล้องกันทั้งในสวนที่พ่นน้ำและไม่พ่นน้ำ หลังจากเกิดการระบาดของเพลี้ยไฟ เกษตรกรจะพ่นสารฆ่าแมลงเพื่อควบคุม ส่วนความแตกต่างของจำนวนเพลี้ยไฟ จากการสำรวจ 10 ครั้ง พบว่ามีเพลี้ยไฟในแปลงพ่นน้ำน้อยกว่าแปลงไม่พ่นน้ำ 8 ครั้ง พบมากกว่า 2 ครั้ง จึงแสดงว่าการพ่นน้ำในแปลงส้มอาจมีส่วนช่วยลดการระบาดของเพลี้ยไฟได้

หนอนชอนใบ พบมากในช่วงส้มแตกใบอ่อน (เดือนตุลาคมและปลายเดือนกุมภาพันธ์) ซึ่งเกษตรกรเจ้าของสวนจะพ่นสารฆ่าแมลง เพื่อควบคุมการระบาดทุก ๆ ครั้งที่ส้มเริ่มแตกใบอ่อน ความแตกต่างระหว่างของจำนวนหนอนชอนใบในสวนทั้ง 2 สภาพ พบว่าในแปลงที่พ่นน้ำ มีปริมาณหนอนชอนใบน้อยกว่าแปลงไม่พ่นน้ำ 3 ครั้ง และพบมากกว่า 6 ครั้ง ซึ่งแสดงว่าการพ่นน้ำ ทำให้ส้มแตกใบอ่อนมาก หรือแตกใบอ่อนตลอดเวลา จึงทำให้พบหนอนชอนใบบนใบอ่อนมากกว่า

หนอนแปะใบ พบมากในช่วงปลายเดือนพฤศจิกายน –เดือนมกราคม เหมือนกันทั้ง 2 แปลง โดยพบในแปลงพ่นน้ำน้อยกว่า 1 ครั้ง และพบมากกว่า 5 ครั้ง ซึ่งการทำลายของหนอนแปะใบจะพบเฉพาะในใบ

อ่อนเท่านั้น เช่นเดียวกับหนอนชอนใบ และการพ่นน้ำอาจทำให้มีใบอ่อนมากกว่า จึงทำให้พบหนอนแปะใบมากกว่า

ไรแดงแอฟริกัน ทำลายบนใบแก่ พบมากตั้งแต่เริ่มเข้าสำรวจเดือนตุลาคม –พฤศจิกายน และลดลงเมื่อเกษตรกรพ่นสารฆ่าไร ในแปลงพ่นน้ำพบการระบาดของไรแดงแอฟริกันน้อยกว่า 8 ครั้ง และพบมากกว่า 1 ครั้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม มีแนวโน้มว่าสามารถลดการระบาดของไรแดงแอฟริกันได้

ไรเหลืองส้ม พบการระบาดน้อย จากการสำรวจพบในช่วงปลายเดือน ธันวาคม – ต้นเดือน มกราคม โดยระบาดเป็นหย่อม ๆ ร่วมกับไรแดงแอฟริกัน มีจำนวนเฉลี่ยใกล้เคียงกันในระหว่างแปลงพ่นน้ำและไม่พ่นน้ำ

ไรสนิมส้ม พบระบาดเพียงครั้งเดียวในเดือนมกราคม โดยพบเฉพาะในแปลงพ่นน้ำ เนื่องจากตามธรรมชาติของไรสนิมส้มมักระบาดในสวนส้มที่อากาศเย็นและชุ่มชื้น จึงมีแนวโน้มว่า การพ่นน้ำในแปลงส้ม อาจช่วยส่งเสริมให้มีการระบาดของไรสนิมส้มเพิ่มขึ้น

ไรตัวห้ำ พบว่ามีไรตัวห้ำในแปลงพ่นน้ำในเดือนธันวาคมสูงเฉลี่ย 0.43 ตัว/ช่อ และพบอีกครั้งต้นเดือน มกราคม ในการสำรวจครั้งต่อ ๆ ไปไม่พบไรตัวห้ำอีก อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากเกษตรกรใช้สาร ethion ซึ่งอันตรายต่อไรตัวห้ำมาก ในช่วงวันที่ 18 ธันวาคม จากการสำรวจพบไรตัวห้ำมากในแปลงพ่นน้ำ จึงเป็นไปได้ว่า ไรตัวห้ำชอบอาศัยอยู่ในสภาพสวนส้มที่มีความชื้นสูงมากกว่า

สรุปผลการเปรียบเทียบจำนวนแมลงและไรในแปลงส้มที่พ่นน้ำและไม่พ่นน้ำ ช่วงที่ 1

1. การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม มีแนวโน้มว่าสามารถช่วยลดประชากรของ เพลี้ยไฟ และไรแดงแอฟริกันได้ เนื่องจากทำให้ต้นส้มมีความชื้นสูงกว่า
2. การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม อาจช่วยส่งเสริมให้ต้นส้มแตกใบอ่อนอยู่ตลอดเวลา ทำให้พบประชากรของหนอนชอนใบ และหนอนแปะใบมากกว่าแปลงส้มที่ไม่พ่นน้ำ
3. การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม มีแนวโน้มทำให้มีการระบาดของไรสนิมส้มเพิ่มขึ้น เนื่องจากตามธรรมชาติของไรสนิมส้มมักระบาดในที่อากาศเย็นและชุ่มชื้น

ผลการเปรียบเทียบจำนวนแมลงและไรในแปลงส้มที่พ่นน้ำและไม่พ่นน้ำ ช่วงที่ 2

การทดลองในช่วงเดือนมีนาคม 2546 ถึง สิงหาคม 2546 เกษตรกรเจ้าของแปลงทดลองเปิดให้น้ำเหนือทรงพุ่มในแปลงทดลองพ่นน้ำเป็นระยะสั้นๆ (2 - 3 วัน) เฉพาะในช่วงต้นเดือนมิถุนายนเท่านั้น เนื่องจากเป็นฤดูฝน และต่อมาเกษตรกรเจ้าของสวนส้มพบว่าน้ำในสวนส้มมีตะกอนมาก เมื่อปล่อยน้ำเหนือทรงพุ่ม ทำให้ติดใบส้มเป็นคราบขาวขุ่นเคลือบใบไม่มีความเขียวมัน เกษตรกรจึงต้องหยุดการให้น้ำเหนือทรงพุ่ม

ผลการสำรวจ 12 ครั้ง ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ในช่วงเดือนมีนาคม 2545 ถึง สิงหาคม 2546 พบแมลงศัตรูที่สำคัญ นอกเหนือจากการสำรวจใน 6 เดือนแรก เพิ่มขึ้นอีก 2 ชนิด คือ เพลี้ยหอย และเพลี้ยอ่อน โดยเฉพาะ

เพลี้ยหอยพบว่ามีการระบาดมาก การป้องกันกำจัดในขั้นแรกใช้วิธีพ่นสาร ปิโตรเลียม สเปรย์ ออยล์ เพราะว่าปลอดภัยต่อศัตรูธรรมชาติ แต่พบว่าไม่ได้ผล จึงจำเป็น พ่นสารฯ ที่จัดอยู่ในกลุ่มอันตรายสูง เช่น endosunfan, chlopyrifos ส่วนไรศัตรูพืชพบ 2 ชนิด คือ ไรแดงแอฟริกัน และไรสนิมส้ม รวมทั้งพบไรตัวห้ำ *Amblyseius longispinosus* และไรตัวห้ำในวงศ์ Phytoseiidae อื่น ๆ

การสำรวจแมลงที่สำคัญในแปลงพ่นน้ำและไม่พ่นน้ำเหนือทรงพุ่ม พบจำนวนมีค่าเฉลี่ยแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 ส่วนการพ่นสารป้องกันกำจัดโรคแมลงและวัชพืช ซึ่งเป็นการปฏิบัติของเกษตรกรแสดงไว้ในตารางที่ 5 สรุปได้ดังนี้ คือ

เพลี้ยไฟ พบการระบาดของเพลี้ยไฟน้อยมากเมื่อเทียบกับการระบาดในช่วงเดือน ตุลาคม 2545 – กุมภาพันธ์ 2546 เกษตรกรใช้สารที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ จึงสามารถควบคุมเพลี้ยไฟได้ พบค่าเฉลี่ยของเพลี้ยไฟไม่ถึง 2 ตัว/ช่อ จำนวนเพลี้ยไฟของทั้งแปลงพ่นและไม่พ่นน้ำมีปริมาณใกล้เคียงกัน

หนอนชอนใบ พบระบาดมากกว่าช่วง 6 เดือนแรก โดยพบมากในวันที่ 1 พฤกษาคม สูงถึง 10 ตัว/ช่อใบ หลังจากนั้นเกษตรกรจึงพ่นสารกำจัดหนอนชอนใบ จากการติดตามพบว่าหนอนชอนใบจะระบาดทุกครั้งที่ส้มแตกใบอ่อน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเกษตรกรจะตัดสินใจว่าต้องการจะรักษาใบชุดนั้นไว้หรือไม่ ถ้าต้องการใบชุดใหม่ที่สมบูรณ์เพื่อให้แตกตาดอก ก็จะพ่นสารกำจัดหนอนชอนใบ เช่น imidacloprid ตั้งแต่เริ่มแตกใบอ่อนใหม่ ๆ จากการสำรวจพบว่าปริมาณหนอนชอนใบในแปลงพ่นน้ำและไม่พ่นน้ำมีปริมาณมากและน้อยในช่วงเวลาต่าง ๆ ใกล้เคียงกัน

หนอนแปะใบ ในฤดูฝนพบหนอนแปะใบเป็นปริมาณน้อยมาก (ไม่ถึง 1 ตัว/ช่อใบ) ซึ่งแตกต่างจากช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546 ที่พบการระบาดเฉลี่ยในทุกกรรมวิธี 4 – 5 ตัว/ช่อใบ เกษตรกรจึงพ่นสาร Bt และสาร protiofos เพื่อป้องกันกำจัดหนอนแปะใบ 3 ครั้ง ส่วนความแตกต่างของปริมาณหนอนแปะใบในสวนพ่นน้ำมีเฉลี่ยสูงกว่าในแปลงไม่พ่นน้ำเล็กน้อย อาจเป็นเพราะเนื่องจากการระบาดในส่วนพ่นน้ำในช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546 ทำให้ประชากรของหนอนแปะใบในแปลงพ่นน้ำซึ่งเข้าดักแด้อยู่บนใบมีมากกว่าแปลงไม่พ่นน้ำ

เพลี้ยหอย ในเดือนมีนาคม – เมษายน 2546 เกิดการระบาดของเพลี้ยหอยอย่างรวดเร็ว โดยลงทำลายบนผล และต่อเนื่องไปบนกิ่ง ในระยะแรกเกษตรกรพ่นสารปิโตรเลียม สเปรย์ออยล์ เพื่อให้ปลอดภัยต่อไรตัวห้ำที่กำลังดำเนินการปล่อยในกรรมวิธีปล่อยไรตัวห้ำ แต่พบว่าไม่สามารถควบคุมเพลี้ยหอยได้ เกษตรกรจึงต้องพ่นสาร cyfluthrin, endosulfan และ chlorpyrifos จากนั้นพบว่า สามารถควบคุมเพลี้ยหอยได้ และพบระบาดมากอีกในเดือนพฤษภาคม เกษตรกรยังคงพ่นสารป้องกันกำจัดเพลี้ยหอยอีก เช่น methomyl จนถึงเดือนสิงหาคม จึงไม่พบเพลี้ยหอย เปอร์เซ็นต์การระบาดของเพลี้ยหอยในแปลงพ่นน้ำพบว่ามีสูงกว่าแปลงไม่พ่นน้ำ

ไรแดงแอฟริกัน ปริมาณไรแดงแอฟริกันพบมากในช่วงเดือนมีนาคม 2546 ทั้ง 2 แปลง เกษตรกรพ่นสารฆ่าไร ethion และพ่นสาร endosulfan เพื่อกำจัดเพลี้ยหอย ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าไรด้วย ดังนั้นปริมาณ

ไรจึงลดลง และเพิ่มมากขึ้นอีกในช่วงเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม เกษตรกรพ่นสารฆ่าไร pyridaben เพื่อกำจัดไรอีก 2 ครั้ง ค่าเฉลี่ยจำนวนไรแดงแอฟริกันในแปลงพ่นน้ำมีน้อยกว่าในแปลงไม่พ่นน้ำเล็กน้อย

ไรสนิมส้ม พบมากในเวลาเดียวกันกับไรแดงแอฟริกัน และลดน้อยลงเมื่อพ่นสารฆ่าไร ethion พบเพิ่มขึ้นในช่วงเดือนกรกฎาคม – สิงหาคม 2546 หลังจากพ่นสาร pyridaben ก็ไม่พบการระบาดอีก จำนวนไรสนิมไม่มีความแตกต่างกันระหว่างแปลงพ่นน้ำ และไม่พ่นน้ำ

ไรตัวห้ำ ในช่วง 6 เดือนหลังที่มีฝนตก พบว่ามีปริมาณไรตัวห้ำสูงกว่าในช่วงฤดูแล้ง (ช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546) โดยพบเฉลี่ยสูงถึง 6 ตัว/ช่อใบ เป็นไรตัวห้ำ *Amblyseius longispinosus* และไรในวงศ์ Phytoseiidae อื่น ๆ เช่น *A. largoensis, A. cinctus* ซึ่งอาจจะเป็นตัวห้ำของเพลี้ยไฟในระยะไข่และตัวอ่อนได้ แต่เมื่อเกษตรกรต้องพ่นสารกำจัดวัชพืช (บาสต้าเอกซ์ + กรัมม๊อกโซน) ใต้ทรงพุ่มต้นส้ม ในวันที่ 30 กรกฎาคม เพราะขาดแรงงานตัดหญ้า เนื่องจากเป็นฤดูฝนต้นหญ้าขึ้นสูงและเติบโตรวดเร็วมาก ซึ่งสารกำจัดวัชพืชอาจมีผลร้ายแรงต่อไรตัวห้ำ ทำให้สำรวจไม่พบไรตัวห้ำอีกเลยในวันที่ 7 สิงหาคม (ตารางที่ 4)

สรุปผลการเปรียบเทียบจำนวนแมลงและไรในแปลงส้มที่พ่นน้ำและไม่พ่นน้ำ ช่วงที่ 2

1. พบว่าจำนวนเพลี้ยไฟและไรในแปลงพ่นน้ำ และไม่พ่นน้ำ มีจำนวนใกล้เคียงกัน ดังนั้นจากข้อสรุปผลของช่วง 6 เดือนแรก (ช่วงเดือนตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546) ที่ว่า การให้น้ำเหนือทรงพุ่มในแปลงพ่นน้ำ มีอิทธิพลช่วยลดการระบาดของเพลี้ยไฟและไรแดงอาจจะเป็นจริงได้เพราะเมื่อเกษตรกรงดการพ่นน้ำเหนือทรงพุ่มในช่วงที่ 2 แล้ว ทำให้สภาพของทั้ง 2 แปลงไม่มีการพ่นน้ำเหมือนกัน จึง พบว่าปริมาณเพลี้ยไฟและไรแดงใน ทั้ง 2 แปลงมีจำนวนใกล้เคียงกัน

2. หนอนชอนใบ เมื่องดการให้น้ำเหนือทรงพุ่ม พบว่าหนอนชอนใบในแปลงทั้ง 2 มีจำนวนใกล้เคียงกัน

3. หนอนแปะใบ ยังคงพบในแปลงพ่นน้ำมากกว่า

4. เพลี้ยหอย พบประชากรในแปลงพ่นน้ำมีมากกว่าในแปลงไม่พ่นน้ำ

5. ไรแดงแอฟริกัน ไรสนิมส้ม และไรตัวห้ำ พบมีจำนวนใกล้เคียงกันในทั้ง 2 แปลง

6. การพ่นสารกำจัดวัชพืชมีผลกับปริมาณไรตัวห้ำ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปัญหาที่เกิดขึ้นในแปลงทดลอง คือ ไม่สามารถกำหนดให้มีการพ่นน้ำในแปลงทดลองได้อย่างต่อเนื่อง และ ไม่สามารถงดการพ่นสารฆ่าแมลง และไร ศัตรูพืชในแปลงได้ เพราะเกษตรกรไม่ยอม ให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต ดังนั้นการทดลองจึงต้องดำเนินการเพียงปีเดียว สรุปผลของการพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่มส้มเขียวหวานมีต่อการควบคุมแมลงและไรได้ดังนี้ คือ

1. การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม มีแนวโน้มว่าสามารถช่วยลดประชากรของ เพลี้ยไฟ และไรแดงแอฟริกันได้

2. การพ่นน้ำเหนือยอดทรงพุ่ม ช่วยส่งเสริมให้ต้นส้มแตกใบอ่อนอยู่ตลอดเวลา ทำให้พบประชากรของหนอนชอนใบ และหนอนแปะใบมากกว่าแปลงส้มที่ไม่พ่นน้ำ และมีแนวโน้มทำให้มีการระบาดของไรสนิมส้มเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อช่อใบ หรือ ช่อดอก ที่พบในต้นส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุน แปลงที่พ่นน้ำ และไม่พ่นน้ำ (อ.ตาคลี จ.นครสวรรค์, ตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546)

วันที่สำรวจ	เพลี้ยไฟ		หนอนชอนใบ		หนอนแปะใบ	
	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ
17 ต.ค. 45	0.003*	0.11	1.06*	3.25	0	0
31 ต.ค. 45	0*	0.063	1.61	1.25	0	0
14 พ.ย. 45	0.91*	1.11	2.29	0.32	0	0
28 พ.ย. 45	0.71*	0.78	0.44*	0.45	5.21	4.19
12 ธ.ค. 45	0.19*	0.22	0.03*	1.27	1.09	0.80
26 ธ.ค. 45	0.42	0.19	0.08	0.08	0.36	0.10
9 ม.ค. 46	2.17*	4.75	0.03	0.015	0.22*	0.28
23 ม.ค. 46	0.31*	0.44	0.14	0	0.06	0
6 ก.พ. 46	0.13*	0.32	3.56	1.99	0.23	0.02
20 ก.พ. 46	3.01	1.64	0.93	0.54	0.15	0.15
	พ่นน้ำ < 8 ครั้ง พ่นน้ำ > 2 ครั้ง		พ่นน้ำ < 3 ครั้ง พ่นน้ำ > 6 ครั้ง		พ่นน้ำ < 1 ครั้ง พ่นน้ำ > 5 ครั้ง	

* แปลงพ่นน้ำมีจำนวนแมลงน้อยกว่า

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนไรชนิดต่าง ๆ ต่อใบ ที่พบในต้นส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนแปลงที่พ่นน้ำ และไม่พ่นน้ำ (อ.ตาคลี จ.นครสวรรค์, ตุลาคม 2545 ถึง กุมภาพันธ์ 2546)

วันที่สำรวจ	ไรแดงแอฟริกัน		ไรเหลืองส้ม		ไรสนิมส้ม		ไรตัวห้ำ	
	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ
17 ต.ค. 45	11.99	4.73	0	0	0	0	0	0
31 ต.ค. 45	0.71*	1.66	0	0	0	0	0	0
14 พ.ย. 45	5.88*	8.23	0	0	0	0	0	0
28 พ.ย. 45	1.75*	3.44	0	0	0	0	0	0
12 ธ.ค. 45	0.03*	0.09	0	0	0	0	0.43	0
26 ธ.ค. 45	0.05	0.05	0*	0.02	0	0	0	0
9 ม.ค. 46	0.18*	0.78	0.5	0	0.26	0	0.02	0.02
23 ม.ค. 46	0.01*	0.52	0	0	0	0	0	0
6 ก.พ. 46	0.06*	0.08	0	0	0	0	0	0
20 ก.พ. 46	0.04*	0.59	0	0	0	0	0	0
	พ่นน้ำ < 8 ครั้ง พ่นน้ำ > 1 ครั้ง		พ่นน้ำ < 1 ครั้ง พ่นน้ำ > 1 ครั้ง		พ่นน้ำ > 1 ครั้ง		พ่นน้ำ > 1 ครั้ง	

*แปลงพ่นน้ำมีจำนวนแมลงน้อยกว่า

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยจำนวนแมลงชนิดต่าง ๆ ต่อช่อใบ หรือ ช่อดอก ที่พบในต้นส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุน แปลงที่พ่นน้ำ และไม่พ่นน้ำ (อ.ตาคลี จ.นครสวรรค์, มีนาคม 2546 ถึง สิงหาคม 2546)

วันที่สำรวจ	เพลี้ยไฟ		หนอนชอนใบ		หนอนแปะใบ		เพลี้ยหอย (%)		เพลี้ยอ่อน	
	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ
6 มี.ค. 46	1.50*	1.84	0*	0.03	0*	0.03	0	0	0	0
20 มี.ค. 46	0.11	0	0*	0.25	0	0	74.54	61.72	0	0
3 เม.ย. 46	0*	0.05	2.77*	3.08	0	0	60.63	25.94	0	0
17 เม.ย. 46	0.33	0.11	1.99	1.50	0.06	0.03	9.08	5.47	0	0
1 พ.ค. 46	0.27*	0.47	10.00	9.21	0.19	0.10	8.60*	13.91	0	0
14 พ.ค. 46	0.20	0.08	0.05	0	0.28	0.06	31.56	17.35	0	0
29 พ.ค. 46	0.13*	0.31	0*	0.08	0.05*	0.10	17.04	7.19	0	0
12 มิ.ย. 46	0.24	0.03	0.13	0	0.39*	0.41	0	0	0	0
26 มิ.ย. 46	1.60	0.61	0*	0.80	0.13	0.08	0	0	0	0
10 ก.ค. 46	0.35*	0.95	0.54	0.09	0.33	0.09	9.72	4.85	0	0.23
7 ส.ค. 46	0.53	0.06	0.72	0.02	0.05	0.02	0	0	0	0
	พ่นน้ำ < 5 ครั้ง พ่นน้ำ > 6 ครั้ง		พ่นน้ำ < 5 ครั้ง พ่นน้ำ > 6 ครั้ง		พ่นน้ำ < 3ครั้ง พ่นน้ำ > 6 ครั้ง		พ่นน้ำ < 1 ครั้ง พ่นน้ำ > 6 ครั้ง		พ่นน้ำ < 1 ครั้ง พ่นน้ำ > 0 ครั้ง	

*แปลงพ่นน้ำมีจำนวนแมลงน้อยกว่า

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยของจำนวนไรชนิดต่าง ๆ ต่อใบ ที่พบในต้นส้มเขียวหวานพันธุ์โชกุนแปลงที่พ่นน้ำ และไม่พ่นน้ำ (อ.ตาคลี จ.นครสวรรค์, มีนาคม 2546 ถึง สิงหาคม 2546)

วันที่สำรวจ	ไรแดงแอฟริกัน		ไรสนิมส้ม		ไรตัวห้ำ	
	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ	พ่นน้ำ	ไม่พ่นน้ำ
6 มี.ค. 46	0.69	0.15	0	0	0	0
20 มี.ค. 46	6.58	5.49	6.77	4.33	0	0
3 เม.ย. 46	0.07*	0.78	0	0	0	0
17 เม.ย. 46	0.03*	0.53	0	0	0.36	0.27
1 พ.ค. 46	0.03	0	0	0	0.03*	0.13
14 พ.ค. 46	0*	0.02	0	0	0.01	0.01
29 พ.ค. 46	0	0	0*	0.03	0.05*	0.08
12 มิ.ย. 46	0*	0.10	0.03	0	0.20*	0.49
26 มิ.ย. 46	0	0	0.03*	0.22	1.25	1.22
10 ก.ค. 46	0.15*	0.58	0.5*	0.92	0.45*	1.00
24 ก.ค. 46	0.20*	0.52	-	-	-	-
7 ส.ค. 46	0.52	0.42	0.39	0.13	0	0
	พ่นน้ำ < 6 ครั้ง พ่นน้ำ > 4 ครั้ง		พ่นน้ำ < 3 ครั้ง พ่นน้ำ > 3 ครั้ง		พ่นน้ำ < 4 ครั้ง พ่นน้ำ > 3 ครั้ง	

*แปลงพ่นน้ำมีจำนวนไรน้อยกว่า

ตารางที่ 5 การพ่นสารกำจัดศัตรูพืช และการพ่นน้ำ ของเกษตรกรในสวนส้ม (อ.ตาคลี จ .นครสวรรค์, มีนาคม 2546 ถึง สิงหาคม 2546)

วันที่	สารฆ่าแมลง	สารกำจัดโรคพืช	สารกำจัดวัชพืช	ศัตรูพืช
26 ก.พ. 46	1. filpronil (Ascend) 2. petroleum oil	-	-	เพลี้ยไฟ, หนอนชอนใบ, เพลี้ยหอย
3 มี.ค. 46	imidacloprid (Admire)	-	-	เพลี้ยหอย, หนอนชอนใบ
7 มี.ค. 46	petroleum spray oil	-	-	เพลี้ยหอย
9 มี.ค. 46	Bt	-	-	หนอนแปะใบ
26, 27 มี.ค. 46	1. cyfluthrin (Baythroid) 2. endosunfan 3. ethion 4. imidacloprid(Admire)	-	-	เพลี้ยไฟ เพลี้ยหอย ไรแดงแอฟริกัน หนอนชอนใบ
3 เม.ย. 46	1. cyfluthrin (Baythroid) 2. endosunfan 3. ethion 4. imidacloprid(Admire)	-	-	เพลี้ยไฟ เพลี้ยหอย หนอนชอนใบ ไรแดงแอฟริกัน
17 เม.ย. 46	1. chlorpyrifos 2. endosunfan 3. abamectin	-	-	เพลี้ยหอย หนอนชอนใบ เพลี้ยไฟ ไรแดงแอฟริกัน
7 พ.ค. 46	1. protiofos (Tokuthion)	-	-	หนอนแปะใบ
21 พ.ค. 46	1. protiofos (Tokuthion) 2. methomyl (Lannate)	-	-	หนอนแปะใบ เพลี้ยหอย
6 มิ.ย. 46	1. filpronil (Ascend)	1. แอนทาโคล		เพลี้ยไฟ
20 มิ.ย. 46	1. petroleum spray oil	1. copper sulphate		หนอนชอนใบ โรคแคงเกอร์ โรคสแคบ
3 ก.ค. 46	1. imidacloprid(Admire)	-	-	เพลี้ยไฟ
30 ก.ค. 46	3. ethion (Ethion)	1. แอนทาโคล	1.บาสต้าเอ๊กซ์ +กรัมม๊อกโซน	ไรแดงแอฟริกัน โรคสแคป, วัชพืช
7 ส.ค. 46	1. pyridaben(sanmite)	-	-	ไรแดงแอฟริกัน
10, 13 ส.ค. 46	1. pyridaben(sanmite)	1. carbendazim		ไรแดงแอฟริกัน ไรสนิม โรคแคงเกอร์,สแคป

ศึกษาประชากรตามฤดูกาลของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Kerny และแมลงศัตรูธรรมชาติในมะเขือ

Study on the Seasonal Abundance of *Thrips palmi* Kerny and Its Natural Enemies in Egg Plant

ประภัสสร เชยคำแหง

รัตนา นชะพงษ์ พิมลพร นันทะ

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาประชากรตามฤดูกาลของเพลี้ยไฟฝ้าย *T. palmi* และแมลงศัตรูธรรมชาติ ระหว่างเดือนมีนาคม 2545 - เดือนกุมภาพันธ์ 2546 ในแปลงมะเขือ เขตพื้นที่จังหวัดนครปฐม 2 แปลง และในเขตจังหวัดกาญจนบุรี 2 แปลง รวม 4 แปลง ทำการสำรวจโดยสุ่มนับจำนวนเพลี้ยไฟจากใบมะเขือ 2 ใบต่อต้น จำนวน 25 ต้นต่อแปลง ทำการสำรวจ 2 ครั้ง ต่อเดือน รวม 24 ครั้ง ผลการทดลอง พบประชากรเพลี้ยไฟเฉลี่ยในเดือนมีนาคม 2545 - เดือนกุมภาพันธ์ 2546 ในเขตจังหวัดนครปฐม เท่ากับ 8.41 , 3.09, 3.74, 1.44, 2.70, 2.00, 0.13, 0.00, 0.28, 0.66, 1.44 และ 3.02 ตัวต่อใบ ตามลำดับ ในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบ 4.41, 2.18, 2.95, 1.64, 4.50, 1.44, 0.29, 0.00, 0.70, 0.29, 3.01 และ 6.10 ตัวต่อใบ ตามลำดับ พบศัตรูธรรมชาติ 5 ชนิด ได้แก่ แมลงห้ำ 3 ชนิด คือ มวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp. แมลงช้างปีกใส *Chrysopa* sp.,มวนตัวห้ำ *Orius* sp. แมงมุม และแมลงเบียนยังไม่ทราบชนิด 1 ชนิด จำนวน แมลงศัตรูธรรมชาติ ที่พบแต่ละชนิดตลอดปี ในเขตจังหวัดนครปฐม เท่ากับ 195, 74, 12, 163 และ 9 ตัว ตามลำดับ ในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบ 146, 86, 4, 51 และ 3 ตัว ตามลำดับ

ระหัสทะเบียนวิจัย 45 06 003 005

คำนำ

เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Kerny มีชื่อสามัญว่า Cotton thrips เป็นแมลงในอันดับ Thysanoptera วงศ์ Thripidae ตัวเต็มวัยเป็นแมลงขนาดเล็ก มีลำตัวเรียวยาว ประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร มีสีเหลือง วงจรชีวิตประมาณ 14 วัน ตัวเต็มวัยเคลื่อนไหวได้รวดเร็ว ตัวอ่อนมีสีขาวขุ่น ทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อน จะอาศัยอยู่ตามยอดอ่อน ซอกใบ และใต้ใบพืช จัดเป็น แมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญ มากในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เอเชียตะวันออกเฉียงใต้หมู่เกาะคาราเบียน รวมทั้งหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก มีรายงานว่าพบครั้งแรกในฝ้ายและยาสูบในปี 1920 ที่เกาะสุมาตรา ชวา และในประเทศอินเดีย (ศิริณี 2539) และต่อมาในปี ค.ศ. 1977 พบการระบาดในแตงโมในประเทศฟิลลิปินส์ ตั้งแต่นั้นมาก็พบระบาดทั่วไปในภูมิภาคนี้ และกลายเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญ ลงทำลายพืชผักได้หลายชนิดเป็นแมลงที่มีพืชอาศัยกว้าง (Yoshihara 1982 ; Hirose 1991; Lewis 1997) ต่อจากนั้น Morris and Waterhouse (2001) รายงานว่า พบการระบาดของเพลี้ยไฟฝ้ายในพืชตระกูลมะเขือ และ ตระกูล แตง ในประเทศพม่า นอกจากนั้นยังพบการระบาดในประเทศญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน กัมพูชา รวมทั้งทางตอนใต้ของรัฐฟลอริด้า สหรัฐอเมริกา (Frantz *et al.* 1995)

สำหรับในประเทศไทย Wangboonkong (1981) รายงานว่า เพลี้ยไฟฝ้ายเป็นแมลงศัตรูฝ้ายที่มีการระบาดในพื้นที่การปลูกฝ้ายในเขตภาคกลางของประเทศ ในปี พ.ศ. 2521-2522 นอกจากนั้นปัจจุบันยังพบลงทำลายพืชผัก ไม้ดอก ไม้ประดับหลากหลายชนิด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบเขียว แตงโม แตงกวา มะเขือ มะระ ถั่วฝักยาว มะม่วง ส้มโอ องุ่น งา ทานตะวัน ฝ้าย ยาสูบ ข้าวโพด ส่วนในไม้ดอก ไม้ประดับ เช่น กุหลาบ กล้วยไม้ เบญจมาศ และดาวเรือง เป็นต้น (ปิยะ รัตน์ และคณะ, 2542) ศิริณี (2544) รายงานว่า เพลี้ยไฟสามารถแพร่กระจายไปตามแหล่งต่างๆ ได้ง่าย โดยอาศัยลมพัดพาไป ตัวเต็มวัยสามารถกระโดดได้ จะพบเพลี้ยไฟอยู่ตามส่วนยอดหรือกิ่งของพืช แมลงชนิดนี้จะยิ่งทวีความสำคัญขึ้น เนื่องจากมีพืชอาศัยหลากหลาย การป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชทำได้ยาก เพราะเพลี้ยไฟฝ้ายมีความต้านทานสารเคมีได้เร็ว ทำให้เกษตรกรต้องเปลี่ยนชนิดของสารเคมีในการป้องกันกำจัดอยู่เสมอ มีการใช้สารที่มีอันตรายสูงมากขึ้น และอาจเพิ่มอัตราการใช้สูงขึ้น เป็นผลให้เกิดการตกค้างของสารเคมี ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อม

จากการสำรวจศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยไฟ โกศล (2537) รายงานว่า พบแตนเบียนไข่ *Megaphragma* sp. (Hymenoptera : Trichogrammatidae) ลงทำลายไข่ของเพลี้ยไฟในมะเขือ ที่จังหวัดเชียงใหม่ นอกจากนั้นยังพบไรตัวห้ำ (*Amblysiua* sp.) ด้วงเต่า (*Stethorus* sp.) และมวนตัว

ห้ำ (*Wollastoniella* sp.) ดั้งนั้นการใช้สารฆ่าแมลง จะเกิดผลกระทบโดยตรงต่อศัตรูธรรมชาติหลายชนิดที่พบในแปลง มะเขือ และ อาจจะเป็นผลทำให้การระบาดของเพลี้ยไฟรุนแรงมากขึ้น เนื่องจากเกิดการต้านทานสารฆ่าแมลง และจากการที่แมลงศัตรูธรรมชาติถูกทำลาย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ติดตาม ปริมาณ ประชากรของ เพลี้ยไฟ ที่ลงทำลายในพืช มะเขือ ตลอดทั้งปี รวมทั้ง สำรวจ ชนิดและปริมาณ แมลงศัตรูธรรมชาติเพื่อเป็นข้อมูล พื้นฐานและพัฒนาหาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณศัตรูธรรมชาติในเบื้องต้นที่จะนำไปใช้ในการควบคุมเพลี้ยไฟโดยชีววิธี ซึ่งจะได้เผยแพร่ให้เกษตรกรและผู้เกี่ยวข้องได้ตระหนักถึงบทบาทและความสำคัญของแมลงศัตรูธรรมชาติต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แปลงมะเขือ จำนวน 4 แปลง
- ถุงรีเมย์สำหรับเก็บตัวอย่างแมลง
- กล่องเลี้ยงแมลง
- หลอดเก็บตัวอย่างแมลง
- พู่กัน
- กรรไกร
- กล้องจุลทรรศน์
- สำลี
- แอลกอฮอล์
- เครื่องมือนับแมลง
- อุปกรณ์ที่จำเป็นอื่นๆ

วิธีการ

คัดเลือกแปลงมะเขือของเกษตรกร ในเขตจังหวัดนครปฐม และกาญจนบุรี จังหวัดละ 2 แปลง รวม 4 แปลง ทำการสุ่มต้นมะเขือแปลงละ 25 ต้น ตรวจนับจำนวนเพลี้ยไฟ โดยนับใบที่ 2-3 จากยอด สำรวจต้นละ 2 ใบ รวม 50 ใบต่อครั้ง สุ่มเดือนละ ๒ครั้ง ในขณะที่ทำการตรวจนับเพลี้ยไฟ ก็จะเก็บตัวอย่าง บันทึกจำนวน และชนิดของแมลงศัตรูธรรมชาติ โดยพวกแมลงห้ำจะสังเกตจากในแปลง โดยการเฝ้าดู และเก็บตัวอย่างมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ สำหรับแมลงเบียนทำการรวบรวม

ใบมะเขือที่มีเพลี้ยไฟ จำนวนครั้งละ 100 ตัวอย่าง มาตรวจในห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจดูแมลงเบียน โดยเก็บในกล่องเลี้ยงแมลง ประมาณ 5-7 วัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เดือนมีนาคม 2545 – กุมภาพันธ์ 2546

สถานที่ แปลงมะเขือของเกษตรกร จังหวัดนครปฐม และจังหวัดกาญจนบุรี
ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจประชากรเพลี้ยไฟฝ้ายพบว่าช่วงฤดูแล้งในเดือนมีนาคมถึงเดือน เมษายน 2545 และเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ 2546 จะเป็นช่วงที่พบ เพลี้ยไฟในปริมาณมาก ช่วงที่พบปริมาณของเพลี้ยไ ฟมีปริมาณสูงสุดคือ ในเดือนมีนาคม 2545 พบ 8.41 ตัวต่อใบ ในเขตจังหวัดนครปฐม และในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบปริมาณสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ 2546 เฉลี่ย 6.1 ตัวต่อใบ และจาการสำรวจในครั้งนี้พบว่า ในช่วงเดือนตุลาคม 2545 ทั้ง 4 แปลงไม่พบปริมาณของเพลี้ยไฟ (ตารางที่ 1)

ในช่วงฤดูฝน เดือน พฤษภาคม - สิงหาคม 2545 ยังพบปริมาณเพลี้ยไฟอยู่ตลอดช่วงฤดูนี้ อาจเป็นเพราะในปี 2545 มีฝนทิ้งช่วง มาตั้งแต่ต้นปี จะเห็นว่า ฤดูฝนมาล่าช้ามาก จึงทำให้ปริมาณเพลี้ยไฟยังคงมีอยู่ตลอดช่วงนี้ โดยพบสูงสุด ในเดือน กรกฎาคม ในเขตจังหวัดนครปฐม และกาญจนบุรี เฉลี่ย 2.7 และ 4.5 ตัวต่อใบ ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

ในช่วงฤดูหนาว เดือนกันยายน - ธันวาคม 2545 พบปริมาณเพลี้ยไฟจากแปลงที่สำรวจน้อยลงมาก ซึ่งเป็นอิทธิพลมาจากปริมาณน้ำฝน ที่เริ่มมีมากในเดือนกันยายน ทำให้ในเดือนตุลาคม 2545 ไม่พบเพลี้ยไฟ ในแปลงที่สำรวจ และเริ่มพบเพลี้ยไฟ ในเดือนพฤศจิกายน เฉลี่ย 0.7 ตัวต่อใบ และในเดือนธันวาคม พบเฉลี่ย 0.66 ตัวต่อใบ ในเขตจังหวัดนครปฐม และในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบ เฉลี่ย 0.7 และ 0.29 ตัว/ใบตามลำดับ

แมลงศัตรูธรรมชาติที่สำรวจพบมีแมลงห้ำ 3 ชนิด คือ มวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp. แมลงช้างปีกใส *Chrysopa* sp., มวนตัวห้ำ *Orius* sp. และแมงมุม จำนวนที่พบตลอด ปีในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบ 146, 86, 4 และ 51 ตัว ตามลำดับ ในเขตจังหวัดนครปฐม เท่ากับ 195, 74, 12 และ 163 ตัว ตามลำดับ(ตารางที่ 2 และ3) จะเห็นได้ว่าปริมาณศัตรูธรรมชาติจะแปรผันตามปริมาณของแมลงศัตรูพืช ในช่วงที่มีปริมาณเพลี้ยไฟมาก ก็จะพบแมลงศัตรูธรรมชาติมากเช่นกัน คือในเดือนมีนาคม 2545 ในเขตจังหวัดนครปฐมพบปริมาณเพลี้ยไฟในเดือนมีนาคม 2545 1,682 ตัวและพบมวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp.แมลงช้างปีกใส *Chrysopa* sp., มวนตัวห้ำ *Orius* sp. และแมงมุม 58,10,0,41 ตัวตามลำดับ และในเดือนกันยายน 2545 พบปริมาณเพลี้ยไฟ 26 ตัว และพบศัตรูธรรมชาติมวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp. 7 ตัว แมงมุม 6 ตัวพบแตนเบียน 1 ตัว ส่วนในเดือนตุลาคม จากการสำรวจไม่พบประชากรเพลี้ยไฟในแปลง และ ศัตรูธรรมชาติที่พบคือ มวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp.เพียง 4 ตัว และ แมงมุม 4 ตัว

จากการสำรวจยัง พบแมลงเบียน 1 ชนิด ยังไม่จำแนกชนิด โดยพบ 5 และ 9 ตัวในเขตจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรี พบในปริมาณที่น้อยมาก

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาประชากรตามฤดูกาลของเพลี้ยไฟฝ้ายในแปลงมะเขือ ในเขตจังหวัดนครปฐมและจังหวัดกาญจนบุรี พบว่าปริมาณการระบาดของเพลี้ยไฟจะมีตลอดทั้งปี มีประชากรขึ้นลงตลอดปี ในเขตจังหวัดนครปฐม พบประชากรสูงสุดในเดือนมีนาคม 2545 และพบปริมาณประชากรสลับขึ้นลงตลอดทั้งปี ประชากร เพลี้ยไฟจะน้อยในช่วงเดือนกันยายน - ธันวาคม 2545 และไม่พบเพลี้ยไฟในเดือนตุลาคม สำหรับในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบปริมาณประชากรสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ 2546 นอกจากนั้นจะพบปริมาณประชากรขึ้นลงตลอดทั้งปีเช่นเดียวกัน ยกเว้นช่วงที่มีฝนตกหนัก ประชากรจะลดลงในช่วงเดือนกันยายนถึงธันวาคม จาก ผลการสำรวจ พบว่า เมื่อปริมาณน้ำฝนเริ่มมากขึ้นจะมีผลกับปริมาณการระบาดของเพลี้ยไฟ หลังจากฝนตกปริมาณเพลี้ยไฟจะลดลงสอดคล้องกับรายงานของ Etienne *et al.* (1990) กล่าวว่า ปริมาณฝนที่ตกอย่างหนักจะสามารถทำให้ปริมาณประชากรเพลี้ยไฟลดลงได้ ซึ่งจาก การสำรวจดัง กล่าวพอจะสรุปได้ว่าประชากรของเพลี้ยไฟจะมีมากในช่วงฤดูร้อนและแล้ง ไปจนถึงต้นฤดูฝน เมื่อมีฝนตกชุก ปริมาณประชากรจะลดลงจนบางเดือนไม่พบเพลี้ยไฟเลย เมื่อฝนทิ้งช่วงนานก็จะมีการระบาดอีก ในการสำรวจพบศัตรูธรรมชาติ 5 ชนิด ได้แก่ แมลงห้ำ 3 ชนิด คือ มวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp. แมลงช้างปีกใส *Chrysopa* sp., *Orius* sp. แมงมุม และแ ตนเบียนยังไม่ทราบชนิด 1 ชนิด ปริมาณแมลงศัตรู

ธรรมชาติที่พบจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของเพลี้ยไฟ และ ศัตรูธรรมชาติที่พบมากที่สุด คือ มวนตัวห้ำ *Wollastoniella* sp. ซึ่งมีแนวโน้มว่าน่าจะนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการได้ และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณประชากรของเพลี้ยไฟ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโดยไม่ใช้สารฆ่าแมลง แนะนำให้แก่เกษตรกรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

โกศล เจริญสม และวิวัฒน์ เสือสะอาด . 2537. ศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย เอกสารพิเศษ ฉบับที่ 6 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์/สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ปิยะรัตน์ เขียนมีสุข ,ศิริณี พูนไชยศรี , ศรีสุดา โท้ทอง ,และไพศาล รัตนเสถียร . 2542. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูสำคัญของกล้วยไม้. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเจ้าหน้าที่และเกษตรกรตามโครงการปรับปรุงคุณภาพดอกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี2542 อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี 29 มิถุนายน 2542.

ศิริณี พูนไชยศรี.2539. เพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* Karny. ว.กีฏ.สัตว. 18(4):240-242.

ศิริณี พูนไชยศรี.2544. เพลี้ยไฟ Terebrantia เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

Etienne,J.,J.Guyot and X. van Waetermeulen. 1990. Effect of insecticides, predation, and precipitation on populations of *Thrips palmi* on aubergine (eggplant) inGuadeloupe. Florida Entomol. 73:339-342.

Frantz, G.,F. Parks and H.C. Mellinger. 1995. Thrips population trends in peppers in southwest Florida. Pp. 111-114. In B.L. Parker, M. Skinner and T. Lewis, eds. **Thrips Biology Management.** Plenum Press, New York.

Hirose,Y. 1989**. Exploration for Natural Enemies of *Thrips palmi* in Southeast Asia**. ed. Institute of Biological Control Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka, Japan. (In Japanese)

Lewis, T. 1973. **Thrips their BioloGy and Economic Importance**. Acadamic Press, London and New York.

Morris, H. and D.F.Waterhouse. 2001. **The Distribution and Importance of Arthopod Pests and Weed of Agricuiture in Myanmar.** Australian Centre for International Agricuitural Research (ACIAR), Monograph no. 67.

Wangboonkong, S. 1981. Chemical control of cotton insect pests in Thailand. **Trop.Pest Manage**. 27:495-500.

Yoshihara, T. 1982. **An Overview of Researches on *Thrips Palmi* in Japan**. Kurume Vegetable Experiment Substation, Kurume, Japan.

ตารางที่ 1 ประชากรของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* ในเขต จ.นครปฐม และ จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม 2545 - เดือนกุมภาพันธ์ 2546

เดือนที่สำรวจ	จ.นครปฐม		จ. กาญจนบุรี	
	จำนวนเพลี้ยไฟ[1/]	จำนวนเฉลี่ย ตัว/ใบ[2/]	จำนวนเพลี้ยไฟ[1/]	จำนวนเฉลี่ย ตัว/ใบ[2/]
2545 มีนาคม	1,682	8.41	881	4.41
เมษายน	617	3.09	435	2.18
พฤษภาคม	748	3.74	589	2.95
มิถุนายน	288	1.44	328	1.64
กรกฎาคม	539	2.70	899	4.50
สิงหาคม	400	2.00	288	1.44
กันยายน	26	0.13	58	0.29
ตุลาคม	0	0.00	0	0.00
พฤศจิกายน	56	0.28	139	0.70
ธันวาคม	131	0.66	58	0.29
2546 มกราคม	288	1.44	602	3.01
กุมภาพันธ์	603	3.02	1,220	6.10

[1/] สุ่มนับจากจำนวนตัวอย่าง 200 ใบ

[2/] จำนวนเฉลี่ยจากตัวอย่าง 200 ใบ

ตารางที่ 2 ประชากรของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* และแมลงศัตรูธรรมชาติในแปลงมะเขือ จังหวัดนครปฐม

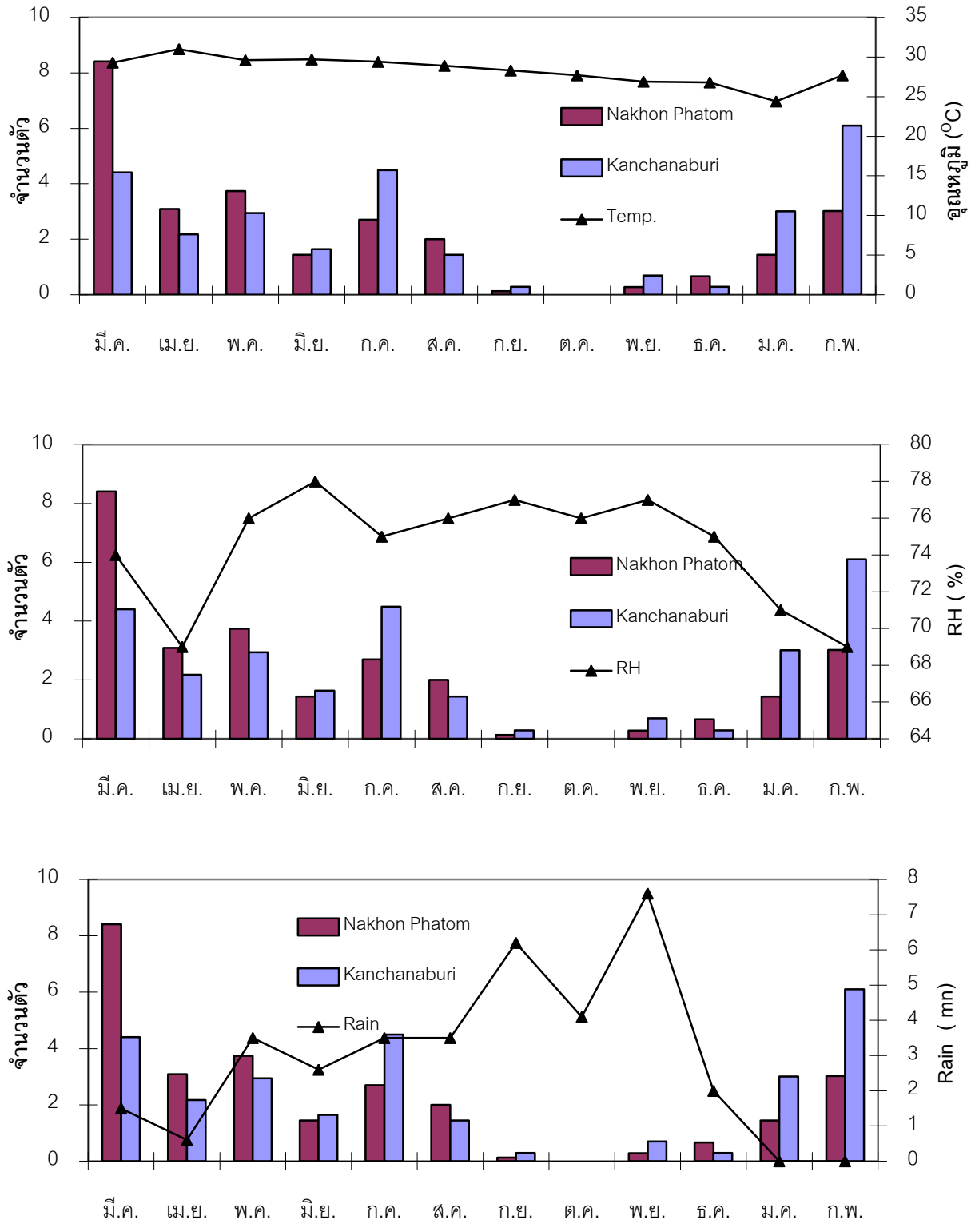
เดือนที่สำรวจ	*T. palmi* [1/]	แมลงศัตรูธรรมชาติ				แมงมุม
		Wollastoniella sp.	*Chrysopa* sp.	*Orius* sp.	แตนเบียน	
2545 มีนาคม	1,682	58	10	0	0	41
เมษายน	617	45	19	0	2	23
พฤษภาคม	748	22	12	3	3	42
มิถุนายน	288	0	2	0	1	11
กรกฎาคม	539	0	0	0	0	14
สิงหาคม	400	1	5	1	0	5
กันยายน	26	7	0	0	1	6
ตุลาคม	0	4	0	0	0	4
พฤศจิกายน	56	11	13	2	0	3
ธันวาคม	131	12	4	0	0	3
2546 มกราคม	288	20	0	5	2	3
กุมภาพันธ์	603	15	9	1	0	8
รวม	5,378	146	86	4	5	51

[1/] สุ่มนับจากจำนวนตัวอย่าง 200 ใบ

ตารางที่ 3 ประชากรของเพลี้ยไฟฝ้าย *Thrips palmi* และแมลงศัตรูธรรมชาติในแปลงมะเขือ จังหวัดกาญจนบุรี

เดือนที่สำรวจ	*T. palmi* [1/]	แมลงศัตรูธรรมชาติ				แมงมุม
		Wollastoniella sp.	*Chrysopa* sp.	*Orius* sp.	แตนเบียน	
2545 มีนาคม	881	27	5	0	3	12
เมษายน	435	32	4	0	0	18
พฤษภาคม	589	21	2	2	0	9
มิถุนายน	328	10	3	0	1	7
กรกฎาคม	899	9	4	0	0	0
สิงหาคม	288	2	2	0	0	0
กันยายน	58	15	3	0	0	0
ตุลาคม	0	2	5	0	0	4
พฤศจิกายน	139	3	4	0	1	0
ธันวาคม	58	9	20	0	0	0
2546 มกราคม	602	12	15	1	0	1
กุมภาพันธ์	1,220	4	19	1	0	0
รวม	5,497	195	74	12	9	163

[1/] สุ่มนับจากจำนวนตัวอย่าง 200 ใบ



ภาพที่ 1 แสดงปริมาณประชากรเพลี้ยไฟฝ้าย T. palmi อุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน จากแปลงมะเขือ จ.นครปฐม และกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม 2545 - กุมภาพันธ์ 2546

พัฒนารูปแบบการผลิตขยายมวนพิฆาต *Eocanthecona furcellata* (Wolff)

Development of Mass Production of Stink Bug, *Eocanthecona furcellata* (Wolff)

รัตนา นชะพงษ์ สุพันธา จิตต์ชื่น

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาพัฒนารูปแบบการผลิตขยายมวนพิฆาต ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช กรมวิชาการเกษตร ปี 2544 – 2546

การศึกษาประกอบด้วย 2 หัวข้อ คือ 1. พัฒนาการผลิตเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต : พัฒนาการผลิตหนอนนกและพัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผัก 2. พัฒนาการผลิตมวนพิฆาต การศึกษาพัฒนาการผลิตหนอนนกเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารของมวนพิฆาตได้ทำการศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเจริญเติบโตของหนอนนก วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 20 ซ้ำ 3 กรรมวิธี คือ การเลี้ยงในที่มีแสงสว่างจากหลอดนีออน 40 วัตต์ ตลอด 24 ชั่วโมง, ให้ความมืดตลอด 24 ชั่วโมง และให้ได้รับแสงตามธรรมชาติ ศึกษา ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของหนอนนก วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 20 ซ้ำ 8 กรรมวิธี คือ อาหารชนิดต่างๆสำหรับเลี้ยงหนอนนกได้แก่ อาหารไก่, อาหารไก่ผสมรำข้าวเจ้า อัตรา 1:1, อาหารเสริมซีรีแลค, รำข้าวเจ้า, อาหารเสริมวีทามิกซ์, รำข้าวสาลี, รำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมวีทามิกซ์ อัตรา 1:1 และรำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมซีรีแลค อัตรา 1:1 และศึกษาระยะการเจริญเติบโตกับความสามารถในการขยายพันธุ์หนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่ พบว่า การเลี้ยงหนอนนกในที่มืดตลอดเวลา และเลี้ยงด้วยอาหารไก่ทำให้หนอนเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ระยะไข่ หนอน และดักแด้ของหนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่มีอายุ 7.30 ± 0.4 76.76 ± 13.83 และ 8.00 ± 0.85 วัน ตามลำดับ และตัวเต็มวัยของหนอนมีระยะก่อนวางไข่และระยะวางไข่ เฉลี่ย 9.64 ± 0.51 และ 28.67 ± 5.81 วัน ตามลำดับ และสามารถวางไข่ได้ 158.00 ± 75.65 ฟอง/ตัวเมีย 1 ตัว

พัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผักด้วยอาหารเทียมเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต พบว่าอาหารเทียมสูตร 1 เป็นอาหารเทียมที่ดีที่สุดสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก เพราะเมื่อนำหนอนกระทู้ผักวัย 5 มาเลี้ยงมวนพิฆาตตั้งแต่ตัวอ่อนวัย 2 ทำให้ตัวเต็มวัยของมวนพิฆาตมี น้ำหนักมากที่สุด โดยมวนพิฆาต 1 ตัว หนัก 0.10±0.02 กรัม และสามารถวางไข่ได้มากที่สุดเฉลี่ย

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06 003 003

397.68 ± 230.05 ฟอง หนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร 1 จะมีระยะไข่ ระยะหนอนวัย 1-2 , 3-5 ดักแด้และตัวเต็มวัย 3.80 ± 0.79 11.75 ± 0.75 5.85 ± 0.80 และ 6.35 ± 0.94 วันตามลำดับ ตัวเต็มวัย 1 ตัว วางไข่ได้ 757.77 ± 108.12 ฟองและมีระยะวางไข่ 3.69 ± 0.48 วัน

พัฒนาวิธีการผลิตมวนพิฆาตสรุปได้ว่า มวนพิฆาตเมื่อเลี้ยงด้วยดักแด้หนอนนกอย่างเดียวจะมีอัตราการตายในระยะตัวอ่อนวัย 2-5 เฉลี่ย 50.23% และเมื่อเลี้ยง มวนพิฆาตด้วยดักแด้หนอนนกร่วมกับหนอนกระทู้ผักวัย 5 มวนพิฆาตจะมีอายุไข่ 7.50 ± 0.53 วัน ตัวอ่อนวัย 1, 2, 3 และ 4-5 อายุ 2.70 ± 0.51 , 3.13 ± 0.48, 3.34 ± 0.50 และ 6.44 ± 1.77 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัย 1 ตัววางไข่ได้ 320.30 ± 91.12 ฟอง มีระยะก่อนวางไข่และระยะวางไข่ 7.58 ± 0.51 และ 16.81 ± 3.76 วัน ตามลำดับ

คำนำ

มวนพิฆาตเป็นแมลงห้ำทั้งระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัย ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายหนอนผีเสื้อทุกชนิดที่อยู่ในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก เป็นต้น มวนพิฆาตมีประสิทธิภาพสูงในการดูดกินหนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผัก ทุกวัย ได้ 5.6 ตัว/วัน จึงสามารถนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูดังกล่าวในหน่อไม้ฝรั่ง องุ่น และถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง 80-90% (รัตนาและคณะ, 2541,2544ก,2544ข และ 2545) มีการเลี้ยงขยายพันธุ์ได้ง่าย มวนพิฆาตจึงเป็นชีวภัณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพืชเศรษฐกิจต่างๆ เพื่อลดการใช้สารเคมีได้ ดังนั้นจึงควรต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาวิธีการผลิตขยายทั้งมวนพิฆาตและเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต ได้แก่ หนอนนก และหนอนกระทู้ผัก เพื่อให้ได้ปริมาณมากแต่มีคุณภาพตามที่ต้องการและต้นทุนการผลิต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล่องพลาสติก
2. หลอดนีออน ขนาด 40 วัตต์
3. ถ้วยพลาสติก ตะกร้าพลาสติก ถาดอลูมิเนียม โหลพลาสติก และชั้นวางภาชนะเลี้ยงแมลง
4. กระดาษโปสเตอร์ดำ
5. แตงกวา
6. อาหารชนิดต่างๆ สำหรับเลี้ยงหนอนนก ได้แก่ อาหารไก่, อาหารไก่ผสมรำข้าวเจ้า อัตรา 1:1, อาหารเสริมซีรีแลค, รำข้าวเจ้า, อาหารเสริมวีทามิกซ์, รำข้าวสาลี, รำข้าวสาลีผสมอาหารเสริม วีทามิกซ์ อัตรา 1:1 และรำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมซีรีแลค อัตรา 1:1

7. อาหารเทียมเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก

8. มวนพิฆาต หนอนกระทู้ผัก และหนอนนก

9. สำลี กระดาษเนื้อเยื่อ กระดาษหนังสือพิมพ์ กระดาษสีขาว พู่กัน ปากคีบ ผ้าสำลี เครื่องชั่งน้ำหนัก เครื่องปั่นอาหาร ถ้วยตวง และไม้บรรทัด

10. กล้องจุลทรรศน์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ และห้องควบคุมอุณหภูมิ

วิธีการ

ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส การศึกษาประกอบด้วย

1. พัฒนาการผลิตเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต: พัฒนาการผลิตหนอนนกและพัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผัก

2. พัฒนาการผลิตมวนพิฆาต

1. พัฒนาการผลิตเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต

1. 1. พัฒนาการผลิตหนอนนก

1.1.1 อิทธิพลของแสงต่อการเจริญเติบโตของหนอนนก

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 20 ซ้ำ 3 กรรมวิธี คือ

1) แสงสว่างจากหลอดฟลูออเรสเซนท์ 40 วัตต์ ตลอด 24 ชั่วโมง

2) มืดตลอด 24 ชั่วโมง

3) แสงตามธรรมชาติ

นำหนอนนกหลังฟักออกจากไข่ 2 สัปดาห์ ใส่กล่องพลาสติก จำนวน 10 ตัว/กล่อง ให้อาหารไก่ และแตงกวาสัปดาห์ละครั้ง นำหนอนนกไปเลี้ยงในสภาพต่างๆ ตามกรรมวิธี จำนวน 1 กล่อง/สภาพ/ซ้ำ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และชั่งน้ำหนักหนอนนก ก่อนทดลองและทุกสัปดาห์

บันทึกข้อมูล น้ำหนักหนอนนกก่อนและตลอดการทดลองสัปดาห์ละครั้ง รวม 8 สัปดาห์ เพื่อนำมาหาน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนที่เพิ่มขึ้น

1.1.2 ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของหนอนนก

ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 °C

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 20 ซ้ำ 8 กรรมวิธี คือ อาหารชนิดต่างๆสำหรับเลี้ยงหนอนนก ได้แก่ อาหารไก่, อาหารไก่ผสมรำข้าวเจ้า อัตรา 1:1, อาหารเสริมซีรีแลค, รำข้าวเจ้า, อาหารเสริมวีทามิกซ์, รำข้าวสาลี, รำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมวีทามิกซ์ อัตรา 1:1 และรำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมซีรีแลค อัตรา 1:1

นำหนอนนกที่มีอายุ 2 สัปดาห์หลังฟักออกจากไข่ ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 2 x 3 นิ้ว จำนวน 10 ตัว/กล่อง พร้อมใส่อาหารชนิดต่างๆดังกล่าว 1 ชนิด/กล่อง/ซ้ำ และแตงกวา สัปดาห์ละครั้ง เลี้ยงหนอนนาน 8 สัปดาห์ และชั่งน้ำหนักหนอนก่อนการทดลอง และตลอดการ ทดลองสัปดาห์ละครั้ง รวม 8 ครั้ง

การเก็บข้อมูล บันทึกน้ำหนักหนอนนกก่อนและตลอดการทดลองสัปดาห์ละครั้งรวม 8 ครั้ง เพื่อนำมาหาน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนที่เพิ่มขึ้น

1.1.3 ระยะการเจริญเติบโต และความสามารถในการขยายพันธุ์หนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่

ตัดกระดาษที่มีไข่หนอนนก ใส่ในกล่องพลาสติก จำนวน 1 กลุ่ม/กล่อง จำนวน 10 กล่อง เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนวัย 1 นับจำนวนหนอนนกให้เหลือจำนวน 10 ตัว/กล่อง ใส่อาหารไก่เพื่อเป็นอาหารของหนอนนก ในระยะที่หนอนนกลอกคราบครั้งสุดท้ายและเข้าดักแด้ ปูพื้นกล่องด้วยกระดาษสีขาว และเมื่อดักแด้ฟักเป็นตัวเต็มวัยวางกระดาษสีขาวที่พับเป็นจีบเล็กๆ แบบพัด ขนาดเล็กกว่ากล่องเล็กน้อยลงในกล่องดังกล่าว สำหรับเป็นที่วางไข่ โรยอาหารไก่ลงไป เพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัย นับจำนวนเพศผู้และเพศเมียของตัวเต็มวัยในแต่ละกล่อง เมื่อตัวเต็มวัยเริ่มวางไข่บนกระดาษ เก็บแผ่นกระดาษที่มีไข่หนอนนกติดอยู่ทุกวันพร้อมตรวจดูจำนวนเพศเมียที่เหลือในแต่ละกล่องจนกว่าตัวเต็มวัยตาย ทำการตรวจหนอนนกที่ทำการทดลองทุกวันตลอดการทดลอง

บันทึกข้อมูล ระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะเวลาวางไข่ และจำนวนเฉลี่ยของไข่หนอนนกต่อเพศเมีย 1 ตัว

1.2.พัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผัก

1.2.1 ปรับปรุงอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อนำไปเป็นอาหารมวนพิฆาต

ศึกษากับอาหารเทียม 2 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 ดัดแปลงมาจากสูตรอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผักของ อุทัย (2544) ประกอบด้วย

ถั่วเขียวบด	130 กรัม
Baker’s yeast	10 กรัม
Methyl para – hydroxybenzoate	3 กรัม
Sorbic acid	2 กรัม
Ascorbic acid	3 กรัม
Choline chloride	0.5 กรัม
Wheat germ	10 กรัม
Agar	12 กรัม
Formalin 40%	3 มิลลิลิตร
Vitamin stock	25 มิลลิลิตร
น้ำ	800 มิลลิลิตร

สูตรที่ 2 ประกอบด้วย

ถั่วเขียวบด	130 กรัม
Methyl parahydroxy benzoate	2.5 กรัม

Agar	13	กรัม
Formalin 40%	2	มิลลิลิตร
น้ำ	750	มิลลิลิตร

นำไข่หนอนกระทู้ผักใส่ถ้วยอาหารเทียมสูตรที่ 1 จำนวน 1 กลุ่ม/ถ้วย เมื่อหนอนกระทู้ผักลอกคราบเป็นวัย 3 แยกหนอนใส่ในถ้วยอาหารเทียมถ้วยใหม่ จำนวน 5 ตัว/ถ้วย จนเป็นวัย 5 เพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงมวนพิฆาตตั้งแต่ระยะตัวอ่อนวัย 3 จนถึงตัวเต็มวัย

ใส่มวนพิฆาตระยะตัวอ่อนวัย 3 จำนวน 1 ตัว/กล่อง ทั้งหมด 100 กล่อง และใส่หนอนกระทู้ผักวัย 5 จำนวน 2 ตัว/กล่อง/วัน เพื่อเป็นเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต เมื่อมวนพิฆาตเป็นตัวเต็มวัยทำการชั่งน้ำหนักมวนพิฆาต เมื่อมวนพิฆาตวางไข่เก็บไข่ทุกวันจนมวนพิฆาตระยะตัวเต็มวัยตาย นับจำนวนมวนพิฆาตที่เหลือหลังทดลอง และจำนวนไข่ของมวนพิฆาต

สำหรับอาหารเทียมสูตรที่ 2 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับอาหารเทียมสูตรที่ 1

บันทึกข้อมูลน้ำหนักมวนพิฆาตระยะตัวเต็มวัย จำนวนมวนพิฆาตที่เหลือหลังทดลอง และปริมาณไข่มวนพิฆาตทั้งหมดต่อเพศเมียที่ได้จากการกินหนอนกระทู้ผักที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร 1 และ 2

1.2.2 ระยะการเจริญเติบโตและความสามารถในการขยายพันธุ์ของหนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียม

นำไข่ของหนอนกระทู้ผักใส่ในถ้วยอาหารเทียมสูตรที่ 1 จำนวน 10 ฟอง/ถ้วย จำนวน 10 ถ้วย เมื่อหนอนลอกคราบเป็นวัย 3 แยกหนอนใส่ในถ้วยอาหารเทียมถ้วยใหม่ จำนวน 1 ตัว/ถ้วย ทั้งหมด 50 ถ้วย จนหนอนเข้าดักแด้ แยกดักแด้จากอาหารเทียมใส่โหลแก้ว โดยใส่เพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว จำนวน 20 โหล ปิดปากโหลด้วยกระดาษเนื้อเยื่อ ใส่สำลีชุบน้ำผึ้ง 10% ในโหลแก้ว เมื่อผีเสื้อตัวเต็มวัยออกจากดักแด้และเริ่มวางไข่ทำการเก็บไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยตาย ตรวจจำนวนหนอนกระทู้ผักในถ้วยทุกวันตลอดการทดลอง

บันทึกข้อมูลระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะวางไข่และจำนวนไข่

2. พัฒนาการผลิตมวนพิฆาต

ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 + 2 องศาเซลเซียส

2.1 ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของมวนพิฆาต

2.2 ระยะการเจริญเติบโตและความสามารถในการขยายพันธุ์ของมวนพิฆาตเมื่อเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผักวัย 5 ร่วมกับดักแด้หนอนนก

นำไข่มวนพิฆาตใส่กล่องพลาสติก จำนวน 10 ฟอง/กล่อง รวม 15 กล่อง มวนพิฆาตระยะตัวอ่อนวัย 1 ยังไม่ให้อาหาร เมื่อมวนพิฆาตเป็นวัย 2 ใส่ดักแด้หนอนนกลงในกล่องพลาสติกนี้จำนวน 10 ตัว/กล่อง เมื่อมวนพิฆาตเป็นวัย 3 แยกมวนพิฆาตใส่กล่องพลาสติกกล่องละ 1 ตัว จำนวน 100 กล่อง เลี้ยงจนเป็นตัวเต็มวัยจึงจับคู่ใส่กล่องพลาสติก 1 คู่/กล่อง และเมื่อตัวเต็มวัยเริ่มวางไข่ เก็บไข่ทุกวันจนตัวเต็มวัยตาย โดยใช้

หนอนกระทู้ผักวัย 5 จำนวน 1 ตัว/กล่อง/วัน และดักแด้หนอนนกจำนวน 5 ตัว/กล่อง/วัน เป็นเหยื่ออาหารของมวนพิฆาตระยะตัวอ่อนวัย 3 จนถึง ตัวเต็มวัย ทำการตรวจมวนพิฆาตในกล่องทุกวัน ตลอดการทดลอง

บันทึกข้อมูล ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะวางไข่และจำนวน ไข่

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2543 - กันยายน 2546

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ
- กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

ผลการทดลอง

1. พัฒนาการผลิตเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต

1. 1. พัฒนาการผลิตหนอนนก

1.1.1 อิทธิพลของแสงต่อการเจริญเติบโตของหนอนนก

การศึกษาพบว่าการเลี้ยงหนอนนกในสภาพที่ได้รับแสงสว่างต่างกัน ทำให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของหนอนเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยการเลี้ยงหนอนในที่มืดตลอด 24 ชั่วโมง นาน 8 สัปดาห์ จะทำให้หนอนมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 0.07 กรัม/ตัว มากกว่าการเลี้ยงให้มีแสงตามธรรมชาติ รองลงมาคือ การเลี้ยงในที่มีแสงจากหลอดนีออนขนาด 40 วัตต์ ตลอด 24 ชั่วโมงนาน 8 สัปดาห์ และในที่ได้รับแสงตามธรรมชาติ เฉลี่ย 0.06 และ 0.05 กรัม/ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 1) หนอนเลี้ยงนกเป็นแมลงศัตรูในโรงเก็บ ซึ่งสภาพภายในโรงเก็บเมล็ดพืชจะมีความอับชื้น และมีแสงสว่างน้อย ดังนั้นหนอนเลี้ยงนกจึงเจริญเติบโตในที่มืด หรือที่มีแสงน้อยได้ดีที่สุด ซึ่งผลการศึกษานี้ทำให้เราสามารถจัดสภาพของห้องเลี้ยงให้เหมาะสม

1.1.2 ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของหนอนนก

การศึกษาพบว่าเมื่อใช้อาหาร 8 ชนิด ดังกล่าวเลี้ยงหนอนนกนาน 8 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของหนอนเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยอาหารไก่ทำให้หนอนมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากที่สุดเฉลี่ย 0.21 กรัม/ตัว รองลงมาคืออาหารไก่ผสมรำข้าวเจ้าอัตรา 1:1 เฉลี่ย 0.14 กรัม/ตัว ส่วนอาหารที่ทำให้หนอนมีน้ำหนักตัวเพิ่มน้อยที่สุด คือ อาหารเสริมซีรีแลค , รำข้าวเจ้า, อาหารเสริมวีทาบิกซ์, รำข้าวสาลี, รำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมวีทาบิกซ์ อัตรา 1:1 และรำข้าวสาลีผสมอาหารเสริมซีรีแลค อัตรา 1:1 เฉลี่ย 0.08, 0.07, 0.07, 0.07, 0.06 และ 0.03 กรัม/ตัว ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

1.1.3 ระยะการเจริญเติบโตและความสามารถในการขยายพันธุ์ของหนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่

การศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงหนอนนกด้วยอาหารไก่ มีระยะไข่เฉลี่ย 7.30 ± 0.48 วัน ระยะหนอนและดักแด้เฉลี่ย 76.76 ± 13.83 และ 8.00 ± 0.85 วันตามลำดับ ตัวเต็มวัยมีระยะก่อนวางไข่เฉลี่ย 9.64± 0.51 วัน และมีระยะวางไข่เฉลี่ย 28.67 ± 5.81 วัน มีความสามารถวางไข่ได้ 158.00 ± 75.65 ฟอง/ตัวเมีย 1 ตัว (ตารางที่ 3) สอดคล้องกับแจ่มจันทร์ (2539) ที่รายงานว่า หนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยรำข้าวสาลีมีระยะไข่ 5 – 7 วัน ระยะหนอน 55 – 75 วัน ระยะดักแด้ 5 – 7 วัน และระยะตัวเต็มวัย 60 – 80 วัน วางไข่ได้ 4 ครั้ง และ ชูวิทย์ (2533) รายงานว่า ตัวเต็มวัยของหนอนนกวางไข่ครั้งละ 35 – 50 ฟอง หลังจากนี้จะสามารถผสมพันธุ์อีก และวางไข่ได้อีกหลายครั้ง

1.2 พัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผัก

1.2.1 ปรับปรุงอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก เพื่อนำไปเป็นอาหารมวนพิฆาต

หนอนกระทู้ผักวัย 5 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร 1 และ สูตร 2 นำมาเลี้ยงมวนพิฆาตตั้งแต่ตัวอ่อนวัย 2 จนถึงตัวเต็มวัย พบว่าตัวเต็มวัยของมวนพิฆาตจะมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.10 ± 0.02 และ 0.08 ± 0.02 กรัม/ตัว ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมาก แต่มวนพิฆาตจะสามารถวางไข่ได้ต่างกัน คือ 397.68 ± 230.05 และ 308.90 ± 222.25 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 4) แสดงว่า หนอนกระทู้ผักที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารเทียมที่มีส่วนผสมต่างกันมีผลทำให้มวนพิฆาตวางไข่แตกต่างกัน อาหารเทียมสูตร 1 เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก เพราะมวนพิฆาตที่กินหนอนกระทู้ผักวัย 5 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร 1 จะสามารถวางไข่ได้ดีที่สุด ซึ่งแตกต่างจากธัตนาและคณะ,2541 ที่รายงานว่า มวนพิฆาตที่เลี้ยงด้วยหนอนกระทู้หอมและหนอนเจาะสมอฝ้ายวางไข่ได้ 343.1 ± 68.3 และ 347.6 ± 56.5 ฟอง/เพศเมีย ตามลำดับ

ดังนั้นหนอนกระทู้ผักที่กินอาหารเทียมสูตร 1 เป็นเหยื่ออาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงมวนพิฆาต

1.2.2 ระยะการเจริญเติบโตและความสามารถในการขยายพันธุ์ของหนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียม

การศึกษาพบว่าระยะไข่ของหนอนกระทู้ผักมีอายุ 3.80±0.79 วัน ระยะหนอนวัยที่ 1–2, วัยที่ 3–5, ดักแด้และตัวเต็มวัย มีอายุ 3.65 ± 0.67,11.75 ± 0.75,5.85 ± 0.80 และ 6.35± 0.94 วัน ตามลำดับ มีระยะก่อนวางไข่นาน 3.00 ± 0.67 วัน และมีระยะวางไข่ 3.69 ± 0.48 วัน ตัวเต็มวัยวางไข่ได้ 797.77 ± 108.12 ฟอง/เพศเมีย (ตารางที่ 5) แตกต่างจาก ปิยรัตน์และคณะ (2542) รายงานว่าหนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยผัก มีระยะไข่ 3 – 4 วัน ระยะหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย 10 – 14, 5 – 7 และ 6 – 7 วัน ตามลำดับ

ดังนั้น หนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียมจะมีระยะหนอนยาวกว่าที่เลี้ยงด้วยผัก

2. การผลิตมวนพิฆาต

2.1 ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของมวนพิฆาต

ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของมวนพิฆาตศึกษาโดยหาอัตราการตายของมวนพิฆาต

จากการศึกษาพบว่าอัตราการตายของมวนพิฆาตในระยะตัวอ่อนของมวนพิฆาตวัยที่ 2, 3, 4 และ 5 โดยใช้ดักแด้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหาร มีอัตราการตายเฉลี่ย 15.75, 20.25, 23.75 และ 27.67% ตามลำดับ มีอัตราการตายรวมของระยะตัวอ่อนวัย 2-5 เฉลี่ย 50.23% (ตารางที่ 6)

การทดลองนี้ให้ผลแตกต่างจาก รัตนา และคณะ (2541) ที่รายงานว่าอัตราการตายของมวนพิฆาตที่เลี้ยงหนอนกระทู้หอมเป็นเหยื่ออาหาร มีอัตราการตายเฉลี่ย 3.5, 3.3, 10.7 และ 12.0% ในมวนพิฆาตระยะตัวอ่อนวัย 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ มีอัตราการตายรวมของระยะตัวอ่อนวัย 2-5 เฉลี่ย 26.7% แสดงว่าเมื่อใช้ดักแด้หนอนนกเลี้ยงมวนพิฆาตจะทำให้มวนพิฆาตมีอัตราการตายในวัยต่างๆ สูงกว่าใช้หนอนศัตรูพืชเลี้ยง

ดังนั้นในการผลิตขยายมวนพิฆาตจึงไม่ควรใช้ดักแด้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงเพียงอย่างเดียว ควรจะให้หนอนศัตรูพืชเป็นอาหารควบคู่กันไป

2.2 ระยะการเจริญเติบโตและความสามารถในการขยายพันธุ์ของมวนพิฆาตเมื่อเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผักวัย 5 และ ดักแด้หนอนนก

ระยะการเจริญเติบโตของมวนพิฆาต เมื่อเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผักวัย 5 ร่วมกับดักแด้หนอนนก มีระยะไข่ 7.50±0.53 วัน ตัวอ่อนวัย 1, 2, 3 และ 4-5 มีอายุนาน 2.70±0.51, 3.13±0.48, 3.34 ± 0.50 และ 6.44 ± 1.77 วัน ตามลำดับ มีระยะก่อนวางไข่นาน 7.58 ± 0.51 วัน และมีระยะวางไข่นาน 16.81±3.76 วัน ตัวเต็มวัยวางไข่ได้ 320.30±91.12 ฟอง/เพศเมีย (ตารางที่ 7) ซึ่งวงจรชีวิตของมวนพิฆาตที่เลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผัก และดักแด้หนอนนก สอดคล้องกับการศึกษา ของรัตนา และคณะ (2541) ที่พบว่า วงจรชีวิตของมวนพิฆาตที่เลี้ยงด้วยหนอนกระทู้หอมและหนอนเจาะฝ้าย แต่ความสามารถในการวางไข่แตกต่างกัน คือมวนพิฆาตที่เลี้ยงด้วยหนอนกระทู้หอมและหนอนเจาะสมอฝ้าย มีระยะไข่ , ตัวอ่อนวัย 1, 2–5 และ ตัวเต็มวัย 7.8±1.0, 2.9±0.8, 15.4 ± 3.1, 22.2 ± 6.8 และ 7.7 ± 1.1, 2.9 ± 2.4, 16.8 ± 0.9, 23.3 ± 5.9 วัน ตามลำดับ และสามารถวางไข่ได้ 343.1 ± 68.3 และ 347.6 ± 56.5 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว

ดังนั้นหนอนกระทู้ผักและดักแด้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงขยายมวนพิฆาต

สรุปผลการทดลอง

พัฒนารูปแบบการผลิตขยายมวนพิฆาตประกอบด้วย 2 หัวข้อ คือ 1. พัฒนาการผลิตเหยื่ออาหารของมวนพิฆาต : พัฒนาการผลิตหนอนนก และพัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผัก 2. การผลิตขยายมวนพิฆาต

พัฒนาการผลิตหนอนนก สรุปได้ว่า การเลี้ยงหนอนนกในที่มืดตลอดเวลา จะทำให้หนอนนกมีการเจริญเติบโตมากที่สุด โดยหนอนจะมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น เฉลี่ย 0.07 กรัม/ตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และการเลี้ยงหนอนด้วยอาหารไก่ จะทำให้หนอนนกมีการเจริญเติบโตมากที่สุด เฉลี่ย 0.21 กรัม/ตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ระยะไข่ หนอน และดักแด้ของหนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่มีอายุ 7.30 ± 0.4 76.76 ± 13.83

และ 8.00 ± 0.85 วัน ตามลำดับ และตัวเต็มวัยของหนอนนก 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ 158.00 ± 75.65 ฟอง/ตัวเมีย 1 ตัว มีระยะก่อนวางไข่และระยะวางไข่ เฉลี่ย 9.64 ± 0.51 และ 28.67 ± 5.81 วัยตามลำดับ

พัฒนาการผลิตหนอนกระทู้ผักด้วยอาหารเทียม สรุปได้ว่า อาหารเทียมสูตร 1 เป็นอาหารเทียมที่ดีที่สุดสำหรับเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก เพราะเมื่อนำหนอนกระทู้ผักวัย 5 มาเลี้ยงมวนพิฆาตตั้งแต่ตัวอ่อนวัย 2 จนถึงตัวเต็มวัย ทำให้ตัวเต็มวัยของมวนพิฆาตมีน้ำหนักมากที่สุดเฉลี่ย 0.10 ± 0.02 กรัม และสามารถวางไข่ได้มากที่สุดเฉลี่ย 397.68 ± 230.05 ฟอง/เพศเมีย หนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร 1 จะมีระยะไข่ ระยะหนอนวัย 1-2 , 3-5 ดักแด้และตัวเต็มวัย 3.80 ± 0.79 11.75 ± 0.75 5.85 ± 0.80 และ 6.35 ± 0.94 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัย 1 ตัว วางไข่ได้ 757.77 ± 108.12 ฟองและมีระยะวางไข่ 3.69 ± 0.48 วัน

พัฒนาการผลิตมวนพิฆาตสรุปได้ว่า มวนพิฆาตเมื่อเลี้ยงด้วยดักแด้หนอนนกจะมีอัตราการตายในระยะตัวอ่อนวัย 2-5 เฉลี่ย 50.23%% และเมื่อเลี้ยงมวนพิฆาตด้วยหนอนกระทู้ผักวัย 5 ร่วมกับดักแด้หนอนนก มวนพิฆาตจะมีอายุไข่ 7.50 ± 0.53 วัน ตัวอ่อนวัย 1, 2, 3 และ 4 – 5 นาน 2.70 ± 0.51 , 3.13 ± 0.48, 3.34 ± 0.50 และ 6.44 ± 1.77 วัน ตามลำดับ ตัวเต็มวัย 1 ตัววางไข่ได้ 320.30 ± 91.12 ฟอง มีระยะก่อนวางไข่และระยะวางไข่ 7.58 ± 0.51 และ 16.81 ± 3.76 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของหนอนนก เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาพแสงที่แตกต่างกันภายในห้องปฏิบัติการซึ่งมีอุณหภูมิ 25 ± 2 °C กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สภาพแสง	น้ำหนักเฉลี่ยของหนอนที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)
มืดตลอดเวลา	0.07 a
มีแสงตลอดเวลา	0.06 b
มีแสงตามธรรมชาติ	0.05c
CV.	6.93%

ตารางที่ 2 น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของหนอนนกหลังให้อาหารชนิดต่างๆ นาน 8 สัปดาห์ ภายใต้ห้องปฏิบัติการที่ 25 ± 2 °C กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ชนิดอาหาร	น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นของหนอนนก (กรัม/ตัว)
อาหารไก่	0.21 a
อาหารไก่ + รำข้าวเจ้า	0.14 b
ซีรีแลค	0.08 c
รำข้าวเจ้า	0.07 c
วีทาบิกซ์	0.07 c
รำข้าวสาลี	0.07 c
รำข้าวสาลีผสมวีทามิกซ์	0.06 c
รำข้าวสาลีผสมซีรีแลค	0.03 c
CV.	0.06%

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ DMTR 1%

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตของหนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่ ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วัยต่างๆ ของหนอนนก	ระยะการเจริญเติบโต (วัน)
ไข่	7.30 ± 0.48
หนอน	76.67 ± 13.83
ดักแด้	8.00 ± 0.85
ตัวเต็มวัย :	
ระยะก่อนวางไข่	9.64 ± 0.51
ระยะวางไข่	28.67 ± 5.81
จำนวนไข่ (ฟอง/ตัว)	158.00 ± 75.65

ตารางที่ 4 น้ำหนักตัวเต็มวัยและจำนวนไข่ของมวนพิฆาตที่ให้หนอนกระทู้ผักวัย 5 ซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตรต่างกันเป็นเหยื่ออาหารตั้งแต่มวนพิฆาตตัวอ่อนวัย 2 – ตัวเต็มวัย ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

อาหารเทียมสูตรที่	น้ำหนักตัวเต็มวัย ค่าเฉลี่ย (กรัม) ± SD	จำนวนไข่ (ฟอง/ตัว)
1	0.10 ± 0.02	397.68 ± 230.05
2	0.08 ± 0.02	308.90 ± 222.25

ตารางที่ 5 ระยะการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเทียม ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วัยต่างๆ ของ หนอนกระทู้ผัก	ระยะการเจริญเติบโต (วัน)
ไข่	3.80 ± 0.79
หนอนวัยที่ :	
1 – 2	3.65 ± 0.67
3 – 5	11.75 ± 0.75
ดักแด้	5.85 ± 0.80
ตัวเต็มวัย	6.35 ± 0.94
ระยะก่อนวางไข่	3.00 ± 0.67
ระยะวางไข่	3.69 ± 0.48
จำนวนไข่ (ฟอง/ตัว)	797.77 ± 108.12

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การตายของมวนพิฆาตแต่ละวัยเมื่อกินดักแด้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหาร ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วัยของมวนพิฆาต	เปอร์เซ็นต์การตายของมวนพิฆาต
ตัวอ่อนวัยที่ :	
2	15.75
3	20.25
4	23.75
5	27.67
2-5	50.23

ตารางที่ 7 ระยะการเจริญเติบโตของมวนพิฆาต เมื่อเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผักวัย 5 กับดักแด้หนอนนก ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

วัยต่างๆ ของมวนพิฆาต	ระยะการเจริญเติบโต (วัน)
ไข่	7.50 ± 0.53
ตัวอ่อนวัย :	
1	2.70 ± 0.51
2	3.13 ± 0.48
3	3.34 ± 0.50
4 – 5	6.44 ± 1.77
ระยะเริ่มวางไข่	7.58 ± 0.51
ระยะวางไข่	16.81 ± 3.76
จำนวนไข่ (ฟอง/ตัว)	320.30 ± 91.12

เอกสารอ้างอิง

แจ่มจันทร์ พิริยะพงศ์. 2525. รายงานคุณค่าอาหารของหนอนเลี้ยงนก. ฝ่ายเพาะเลี้ยงสัตว์ป่า, กองอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมป่าไม้. กรุงเทพฯ.

ชูวิทย์ ศุขปราการ. 2533. มีลวอร์ม. หนอนเลี้ยงนก. กสิกร. 63(3):271-272.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, นงพร กิจบำรุง, จักรพงศ์ พิริยพล, ศรีสุดา โท้ทอง, สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น, ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์, อุราพร ใจเพ็ชร, ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย, สมรวย รุ่งรัตนวารี, และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์. 2542. แมลงศัตรูผัก เห็ด ไม้ดอก และการป้องกันกำจัด. 138 หน้า. ในแมลงศัตรูผัก เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรแมลง-สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 10. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร,กรุงเทพฯ.

รัตนา นชะพงษ์, สุพันธา จิตต์ชื่น และพิมลพร นันทะ . 2541 การใช้มวนพิฆาต *Eocanthecona furcellata* (wolff) ควบคุมหนอนกระทู้หอมในหน่อไม้ฝรั่ง .หน้า 285-302.ในเอกสารการประชุมทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช 2541 ครั้งที่ 11, 3-6 มีนาคม 2541. ณ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

รัตนา นชะพงษ์ . 2544ก. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 87-105

รัตนา นชะพงษ์. 2544ข.การใช้มวนพิฆาต Eocanthecona furcellata (Wolff) ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 208-211 ในการประชุมวิชาการ การป้องกันและกำจัดศตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน ครั้งที่ 4, 29-31 สิงหาคม 2544. ณ โรงแรมรีเจนท์ชะอำ, เพชรบุรี

รัตนา นชะพงษ์ และสุพันธา จิตต์ชื่น 2545 อัตราการปล่อยมวนพิฆาต *Eocanthecona furcellata* (Wolff) ควบคุมหนอนกระทู้ผักในถั่วเหลือง. รายงานผลงานวิจัยปี 2545. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรู พืชทางชีวภาพ, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.(กำลังพิมพ์)

อุทัย เกตุนุติ. 2539. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส. หน้า 128 - 162. ในเอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

การพัฒนารูปแบบการผลิตไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก

Development of large Scale Mass Rearing Technique for Predatory Mites

มานิตา คงชื่นสิน วัฒนา จารณศรี
เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

---

1. คำนำ

ไรตัวห้ำ ได้ดำเนินการศึกษาขั้นตอนต่างๆ ของการวิจัยและพัฒนาการนำศัตรูธรรมชาติไปใช้ประโยชน์เรียบร้อยแล้ว และได้นำไปใช้ในโครงการ การควบคุมไรศัตรูสตรอเบอรี่ โดยวิธีผสมผสาน และกำลังจะดำเนินการศึกษาการใช้ในพืชอื่นต่อไป รวมทั้งเทคนิคการผลิตขยายไรตัวห้ำให้ได้ปริมาณมาก ก่อนที่จะนำไปปล่อยให้ควบคุมไรศัตรูพืชเป้าหมายในแปลงปลูก วิธีการผลิตมักจะถูกปิดเป็นความลับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ถ้าไรตัวห้ำชนิดนั้นๆ สามารถผลิตขยายเป็นการค้าได้ เช่น ไรตัวห้ำ *Amblyseius californicus* ไรตัวห้ำชนิดนี้มีศักยภาพในการกินไรแมงมุม เป็นไรที่พบในแถบประเทศยุโรปและอเมริกา ส่วนในประเทศไทยมีไรตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพดีคือไรตัวห้ำ *Amblyseius longispinosus* ได้มีการทดลองศึกษาการเลี้ยงขยายพันธุ์โดยใช้วิธีเลี้ยงด้วยไรแดงหม่อนบนต้นถั่ว ซึ่งได้ผลดีระดับหนึ่ง (มานิตา และคณะ , 2539) ในการทดลองเลี้ยงขยายเพื่อนำไปปล่อยให้ควบคุมไรสองจุดในแปลงสตรอเบอรี่ ในปี 2540 และ ปี 2541 พบว่ามีค่าใช้จ่ายในการผลิตไรตัวห้ำ *A. longispinosus* ตัวละประมาณ 0.02 และ 0.009 บาท/ตัว ตามลำดับ ซึ่งยังคงเป็นค่าใช้จ่ายที่สูง วิธีการเลี้ยงยังคงยุ่งยาก ซับซ้อน กำหนดเวลาและปริมาณการผลิตได้ไม่แน่นอน ต้องใช้แรงงานและพื้นที่มาก นอกจากนั้น ยังมีไรตัวห้ำที่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุมนำเข้ามาจากประเทศเนเธอร์แลนด์ คือ *A. californicus* ซึ่งได้ทดลองประสิทธิภาพเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการและในสภาพไร่แล้ว พบว่ามีศักยภาพดี สามารถนำมาใช้ควบคุมไรศัตรูพืชในประเทศไทยได้หลายชนิด แต่ยังต้องการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเพื่อการขยายปริมาณ จากเอกสารอ้างอิงการศึกษาในบางประเทศ เช่น ไต้หวัน พบว่าสามารถทำการผลิตขยายไรตัวห้ำจำพวก *Amblyseius* spp. และไรตัวห้ำ *Phytoseiulus* sp. ได้ผลดี ด้วยวิธีการที่รวดเร็วและประหยัดกว่า (Shih, 1999 และ Llewellyn, 1991) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการค้นหาวิธีการ และเทคนิค

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06 014 005

ใหม่ โดยการดัดแปลง และศึกษาจากวิธีการเดิม เพื่อพัฒนาวิธีการผลิตขยายไรตัวห้ำทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ต่างประเทศให้ได้วิธีการที่ง่าย และเหมาะสมกับประเทศไทย สามารถแนะนำให้เกษตรกรรู้จักผลิต และการใช้ประโยชน์จากไรตัวห้ำ รวมไปถึงมีเป้าหมายสนับสนุนให้มีการผลิตเป็นเชิงการค้าต่อไปได้

2. วิธีดำเนินการ

ทำการเปรียบเทียบ การเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ 2 ชนิด คือ *A. californicus* และไรตัวห้ำพันธุ์พื้นเมือง *A. longispinosus* 2 วิธี คือตามแบบของ มานิตา และคณะ (2539) โดยใช้ไรแดงหม่อนเป็นอาหาร และวิธีการใหม่ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Shih (1999)ตามขั้นตอนดังนี้

1.ขั้นตอนการผลิตไรแดงหม่อนให้ได้เป็นปริมาณมากในโรงเรือน โดยการปลูกต้นถั่วพุ่มในตะกร้า ๆ ละประมาณ 180 ต้น จำนวน 10-20 ตะกร้า ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เมื่อต้นถั่วอายุ 2 สัปดาห์ จึงย้ายไรแดงหม่อน (แม่พันธุ์) จากห้องปฏิบัติการลงบนต้นถั่ว เพื่อให้ขยายประชากร โดยต้องมีการควบคุมศัตรูอื่นๆ ของต้นถั่วไม่ให้มีปะปน

2. ขั้นตอนเก็บเกี่ยวไรแดงหม่อน เพื่อนำไปเป็นอาหารไรตัวห้ำ โดยตัดต้นถั่วที่มีไรแดงหม่อนหนาแน่น นำไปล้างด้วยน้ำระบบใช้น้ำฉีดให้ได้ไรแดงหม่อน เป็นเหยื่อสำหรับไรตัวห้ำเป็นจำนวนมาก โดยสามารถแยกเป็นไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของไรแดงหม่อน ขั้นตอนนี้จะต้องปฏิบัติการ พร้อมกับมีการพัฒนาเครื่องมือการแยกไรออกจากใบถั่วให้เหมาะสม โดยดัดแปลงวิธีการของ Shih (1999)

3. ขั้นตอนการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ โดยนำไรแดงหม่อนที่ผลิตได้มาเลี้ยงขยายไรตัวห้ำบนแผ่นกระเบื้อง PE ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส ใต้แสงไฟ 150 lux ตามวิธีการของ Shih (1999)โดยใช้เครื่องมือการให้อาหารที่เรียกว่า air-jet-micro-filler โดยมีการดัดแปลงและพัฒนาตามความเหมาะสม

4. ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวไรตัวห้ำบรรจุใส่ขวด นำไรตัวห้ำที่ผลิตได้ซึ่งเลี้ยงอยู่บนกระเบื้อง PE แยกออกจากเหยื่อ ศึกษาวิธีการใช้เครื่องดูดฝุ่น (vacuum) ขนาดเล็กดูดตัวไรตัวห้ำ เพื่อบรรจุลงในขวดพลาสติก

การบันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกจำนวนไรตัวห้ำแต่ละชนิดที่ผลิตได้ต่อครั้ง และต่อปี

2. บันทึกค่าใช้จ่าย เช่น ค่าแรงงาน ค่าวัสดุอุปกรณ์ ในการผลิตขยายไรตัวห้ำ แต่ละชนิดตลอดระยะเวลา 3 เดือน เพื่อนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยของต้นทุนการผลิต และขีดความสามารถของแรงงานในการผลิตไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบวิธีการผลิตที่พัฒนาแล้วกับวิธีการผลิตแบบเก่า โดยเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายการผลิตต่อไรตัวห้ำ 1 ตัว พื้นที่และเวลาการผลิต

3. ผลงานที่ปฏิบัติมาแล้ว

ทำการเปรียบเทียบ การเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ 2 ชนิด คือ *A. californicus* และไรตัวห้ำพันธุ์พื้นเมือง *A. longispinosus* 2 วิธี คือตามแบบของ มานิตา และคณะ (2539) โดยใช้ไรแดงหม่อนเป็นอาหาร และวิธีการใหม่ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Shih (1999)

4. สรุปผลการทดลอง

ผลการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ 2 ชนิด คือ *Amblyseius californicus* และ *Amblyseius longispinosus* ให้ได้เป็นปริมาณมาก ทำการเปรียบเทียบ 2 วิธีการ คือ วิธีการแบบเก่า โดย การเลี้ยงขยายไรแดงหม่อนให้ได้เป็นปริมาณมากในโรงเรือน ด้วยการปลูกต้นถั่วพุ่มในดินผสมตะกร้า ๆ ละประมาณ 180 ต้น จำนวน 10-20 ตะกร้า ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เมื่อต้นถั่วอายุ 2 สัปดาห์ จึงย้ายไรแดงหม่อน (แม่พันธุ์) จากห้องปฏิบัติการลงบนต้นถั่ว เพื่อให้ขยายประชากร โดยต้องมีการควบคุมศัตรูอื่นๆ ของต้นถั่วไม่ให้มีปะปน จากนั้นจึงปล่อยไรตัวห้ำซึ่งเป็นแม่พันธุ์ลงขยายปริมาณบนต้นถั่วที่มีไรแดงหม่อนอยู่หนาแน่นแล้ว ทิ้งไว้นาน 7-10 วันจึงเก็บเกี่ยว นำเอาไรตัวห้ำไปใช้ในงานวิจัยควบคุมไรศัตรูพืชอื่น ๆ ต่อไป ผลการเลี้ยงแบบวิธีการนี้ สามารถผลิตไรตัวห้ำ แต่ละชนิดได้ประมาณ 4-50,000 ตัวภายในเวลา 2 สัปดาห์ โดยมีแรงงานเป็นคนงาน 1 คน และนักวิชาการ 1 คน คิดเป็นราคา 0.009 บาท/ไรตัวห้ำ 1 ตัว

ส่วนการเลี้ยงขยายแบบใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงขยายไรหม่อน (ไรอาหาร)บนถั่วพุ่ม และถั่วพร้าโดยเพาะเลี้ยงในน้ำ(hydroponics) นำไปล้างไรให้หลุดจากใบพืชด้วยด้วยน้ำ โดยคว่ำต้นถั่วใส่ลงในเครื่องล้างไร ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Shih (1999) ใช้ระบบแรงดันน้ำสูงฉีดให้ ไรแดงหม่อนหลุดออกจากเส้นไยตกลงในตะแกรง ขนาดต่าง ๆ กัน โดยแยกเป็น ไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย เพื่อสะดวกในการนำไปเลี้ยงไรตัวห้ำในกล่องหรือวัสดุอื่น โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำบนต้นพืช จากการทดลองพบว่า ยังมีอุปสรรคในการใช้เครื่องล้างไร เพราะหัวฉีดและแรงดันน้ำไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถล้างไรได้หมด

5. ปัญหาและอุปสรรค

ไม่สามารถใช้เครื่องล้างไรได้อย่างมีประสิทธิภาพ เพราะหัวฉีดและแรงดันน้ำไม่เหมาะสม ไม่สามารถล้างตัวไรแดงหม่อนออกจากใบถั่วได้หมด และเนื่องจากใบถั่วพุ่มที่ใช้เลี้ยงไรมีลักษณะใบอ่อนนิ่ม ใบจึงช้ำได้ง่าย ทำให้ไรไม่หลุดออกจากใบ เมื่อเพิ่มแรงดัน หรือปรับให้หัวฉีดอยู่ใกล้ใบเกินไป ตัวไรจะช้ำและตาย ทำให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวไรแดงหม่อนโดยใช้เครื่องล้างไรนี้ได้ ดังนั้นจึงยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ไรตัวห้ำด้วยวิธีการนี้ได้

6. แนวทางแก้ไข

จำเป็นต้องปรับปรุงหัวฉีดและแรงดันน้ำของเครื่องล้างไรให้เหมาะสม และเปลี่ยนชนิดของถั่วที่ใช้เพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนให้เป็นถั่วที่มีใบแข็งแรงเหมือนถั่วพันธุ์ที่ใช้ในประเทศไต้หวัน เช่น ถั่ว Kidney bean แต่มีอุปสรรค คือถั่วดังกล่าวเป็นถั่วที่เพาะปลูกได้เฉพาะที่ๆมีอากาศหนาวเท่านั้น

7. งานที่จะทำต่อไป

ปรับปรุงเครื่องล้างไรเพื่อทดลองต่อไป และหาข้อสรุปการเปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำที่ดีที่สุด

การพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ, *Amblyseius cucumeris* (Oudemans)

Development of Mass Rearing Technique for Predatory Mite, *Amblyseius cucumeris* (Oudemans)

มานิตา คงชื่นสิน **วัฒนา จารณศรี**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

---

1. คำนำ

ไรตัวห้ำ *Amblyseius cucumeris* เป็นไรที่มีขายเป็นการค้าในยุโรป เพื่อใช้ในการควบคุมเพลี้ยไฟที่สำคัญ เช่น เพลี้ยไฟฝ้าย เพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าไรตัวห้ำชนิดนี้อาศัยอยู่ในประเทศไทยได้ และมีแนวโน้มที่จะนำไปควบคุมเพลี้ยไฟในประเทศไทยได้หลายชนิด Ramakers,P.M.J. (1978 และ1980) พบว่า ไรตัวห้ำชนิดนี้มีประสิทธิภาพมากในการควบคุมเพลี้ยไฟ *Thrips tabaci* ศัตรูในพืชเศษรฐกิจหลายชนิด ไรตัวห้ำ *A. cucumeris* ได้รับการจดทะเบียน เพื่อผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น และประเทศในยุโรป เพื่อขายให้เกษตรกรใช้ปล่อยควบคุมเพลี้ยไฟ *Frankliniella occidentalis, Thrips palmi* ในสตรอเบอรี่ ไม้ดอกไม้ประดับ แตงกวา มะเขือเทศ และมะเขือชนิดต่าง ๆ นอกจากนั้น พบว่า สามารถนำไปใช้ควบคุมไรขาวและไรแมงมุมศัตรูพืชบางชนิดได้ด้วยการผลิตขยายทำได้โดยใช้ไรศัตรูในโรงเก็บและส่วนผสมของธัญพืช (http://www.agrofrontier.com/staff/development.html, http://www.fargro.co.uk/thrips.html, http://www.koppert.nl.html)

2. วิธีดำเนินการ

1. ทดลองเลี้ยงขยายอาหารของไรตัวห้ำ *A. cucumeris* โดยใช้ไรในโรงเก็บ *Tyrophygus putrescentiae* และ *Aleuroglyphus* sp. เปรียบเทียบการใช้ธัญญาพืชชนิดต่าง ๆ เป็นอาหาร เช่น รำข้าวสาลี จมูกข้าวสาลี รำข้าวเจ้า อาหารสัตว์เลี้ยงสำเร็จรูป โดยมียีสต์เป็นส่วนผสม ทำการเปรียบเทียบภาชนะใส่เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ เช่น เพาะเลี้ยงในถาดพลาสติก ถ้วยกระดาษ กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ ศึกษาอุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อหาวิธีการเพาะเลี้ยงไรให้เพิ่มปริมาณได้รวดเร็วที่สุด

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06 014 006

2. ขั้นตอนการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ *A. cucumeris*

นำไรในโรงเก็บมาให้เป็นอาหารแก่ไรตัวห้ำ วางในถาดหล่อด้วยน้ำเพื่อกันไรหนี การเปรียบเทียบภาชนะใส่เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ด้วยเช่นกัน ศึกษาอุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อหาวิธีการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำให้เพิ่มปริมาณได้รวดเร็วที่สุด

3. ประเมินผลการเพิ่มประชากรไรตัวห้ำ ทั้ง 2 ชนิด ดังนี้

3.1. บันทึกจำนวนเหยื่อที่ใช้เป็นอาหารของไรตัวห้ำแต่ละชนิด และจำนวนไรตัวห้ำแต่ชนิดที่ผลิตได้ต่อครั้ง และต่อปี

3.2. บันทึกค่าใช้จ่าย เช่น ค่าแรงงาน ค่าวัสดุอุปกรณ์ ในการผลิตขยายไรตัวห้ำ แต่ละชนิดตลอดระยะเวลา 3 เดือน เพื่อนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยของต้นทุนการผลิต และขีดความสามารถของแรงงานในการผลิตไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก โดยคำนึงถึงการคุ้มทุนมากที่สุด

3. ผลงานที่ปฏิบัติมาแล้ว

ทำการศึกษาการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ *A. cucumeris* ซึ่งเป็นไรตัวห้ำกินเพลี้ยไฟศัตรูพืช โดยการทดลองเลี้ยงด้วยเหยื่อที่เป็นไรศัตรูในโรงเก็บบนอาหาร และภาชนะรูปแบบต่างๆ รวมทั้งศึกษาสภาพอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม

4. สรุปผลการทดลอง

พบว่าไรศัตรูในโรงเก็บ *Aleuroglyphus* sp.เป็นอาหารที่ดี ไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงบนต้นพืช แต่ใช้เพาะเลี้ยงในกล่อง ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงขยายไรตัวห้ำได้ง่ายกว่า ในการศึกษาขั้นต้นได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงไรศัตรูในโรงเก็บให้ได้ปริมาณมาก โดยใช้สูตรอาหารชนิดต่าง ๆ ประกอบด้วยรำข้าวสาลี รำข้าวจ้าว จมูกข้าวสาลี ยีสต์ อาหารหนูขาว และอาหารเสริม natural betaine ผลจากการทดลองใช้สูตรผสมอาหารต่าง ๆ กัน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไร *Aleuroglyphus* sp. ได้เป็นจำนวน 10-15 เท่าได้ในเวลา 1 สัปดาห์ ในเบื้องต้นพบว่า สูตรอาหารที่ดีที่สุดคือ อาหารหนูขาว จมูกข้าวสาลี ผสมยีสต์ และอาหารเสริม natural betaine ส่วนการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไรตัวห้ำ *A. cucumeris* พบว่าเมื่อเลี้ยงโดยใช้ ไร *Aleuroglyphus* sp. เป็นอาหาร สามารถเพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนประมาณ 10 เท่า ในเวลา 2 สัปดาห์

5. ปัญหาและอุปสรรค -

6. แนวทางแก้ไข -

7. งานที่จะทำต่อไป

ทำการทดลองเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. cucumeris* ด้วยไรในโรงเก็บ *T. Putrescentiae* เพื่อเทียบ หาวิธีการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ *A. cucumeris* ที่ดีที่สุด

การพัฒนารูปแบบการผลิตและการใช้แตนเบียนชนิดต่างๆ ในการควบคุมหนอนชอนใบส้ม

Mass Rearing Model of Parasitoids for Controlling Citrus Leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton

รุจ มรกต พิมลพร นันทะ

กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา

บทคัดย่อ

การทดลองพัฒนารูปแบบการผลิตขยายแตนเบียนทำลายชอนใบส้ม 3 ชนิด แตนเบียน *Quadrastichus*sp, *Cirrospilus ingenuus* Gahan และ *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya ณ โรงเรือนสำเร็จรูปของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนตุลาคม 2543 ถึงเดือนกันยายน 2546 โดยการเลี้ยงในกรงขนาด 50x50x100 ซม. มีผลการทดลอง ดังนี้ 1.การเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* sp. โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 25 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม 113-436 ตัว (เฉลี่ย 231.22) สามารถทดลองได้ 18 ครั้ง พบว่าหนอนถูกเบียน 0-95.58 %(เฉลี่ย 44.43%) เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 0-100% (เฉลี่ย 90.17) สามารถผลิตแตนเบียนได้ครั้งละ0-108 ตัวต่อกรง (เฉลี่ย 64.19 ตัว) โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 3.98:1 2. การเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* sp. โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 50 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม110-421 ตัว (เฉลี่ย 249.32) สามารถทดลองได้ 20 ครั้ง พบว่าหนอนถูกเบียน 28.66-73.63 % (เฉลี่ย 55.27%) เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 86.49-99.49% (เฉลี่ย 96.08) สามารถผลิตแตนเบียนได้ครั้งละ58-230 ตัวต่อกรง (เฉลี่ย 174.38ตัว) โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1.69:1 3. การเลี้ยงแตนเบียน *C. ingenuus* โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 25 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม 165-359 ตัว (เฉลี่ย 276.83) สามารถทดลองได้ 16 ครั้ง พบว่าหนอนถูกเบียน 0-3.03 %(เฉลี่ย 0.25%) เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 0-100% (เฉลี่ย 85.25) สามารถผลิตแตนเบียนได้ครั้งละ0-5 ตัวต่อกรง (เฉลี่ย 0.42 ตัว) 4. การเลี้ยงแตนเบียน *A. citricola* สามารถทดลองได้ 1 ครั้ง โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 50 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม 252 ตัว พบว่าหนอนถูกเบียน 42.46 % เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 99.07% สามารถผลิตแตนเบียนได้ 106 ตัวต่อกรง โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 3.24:1 การเลี้ยงขยายพันธ์แตนเบียนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถทำอย่างต่อเนื่องได้เพราะไม่สามารถทำ stock culture ของแตนเบียนได้

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06003 008

คำนำ

หนอนชอนใบส้ม *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และ มะนาว ซึ่งเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย หนอนชนิดนี้ ดูดกินน้ำเลี้ยงจากเนื้อเยื่ออ่อนของส้ม เช่น ใบส้ม และผลส้ม ทำให้ใบส้มหงิกงอ มีแผลทำให้ติดโรคแคงเกอร์ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonus campestris pv.citri* ได้ง่าย และรุนแรง มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของต้นส้มและผลิตผลของส้ม Ujiye *et al.* (1996) สำรวจพบแตนเบียนทำลายหนอนชอนใบส้มในภาคกลางและภาคเหนือของประเทศไทย ถึง 15 ชนิด ในขณะที่รุจ และคณะ (2537, 2539) ได้ศึกษาเปอร์เซ็นต์การถูกทำลายโดยแตนเบียนของหนอนชอนใบส้มในสวนส้มเขียวหวานในจังหวัดปทุมธานีและในสวนส้มโอในจังหวัดชัยนาทและรายงานว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนชอนใบส้มในสวนส้มเขียวหวานอยู่ในระดับต่ำแต่ในสวนส้มโออยู่ในระดับสูงโดยพบค่าเฉลี่ยถึง 57.31% โดยแตนเบียนที่มีประสิทธิภาพมาก 3 อันดับแรก ได้แก่ แตนเบียน *Ageniaspis citricola* Longvinovskaya แตนเบียน *Quadrastichus* sp. และแตนเบียน *Cirrospilus ingenuus* Gahan ได้มีการนำแตนเบียนทั้ง 3 ชนิดไปเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อใช้ในโครงการควบคุมหนอนชอนใบส้มโดยชีววิธีแบบคลาสสิคในประเทศออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกาและอิสราเอล (Neale *et al*., 1995, Smith and Hoy, 1995 และ Argov and Rossler, 1998) รุจ และ พิมลพร (2545) รายงานว่าสามารถเลี้ยงขยายพันธุ์แตนเบียน *Quadrastichus* sp., *C. ingenuus* และ *A. citricola* ได้แต่ผลผลิตต่อหน่วยค่อนข้างต่ำและขาดความต่อเนื่องในการผลิต ดังนั้นควรมี การพัฒนารูปแบบการผลิตแตนเบียนเหล่านี้เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยสูงขึ้น และผลผลิตต่อรอบอย่างต่ำ 1,000 ตัว สามารถนำไปใช้ในงานป้องกันกำจัดหนอนชอนใบส้มโดยชีววิธีต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. โรงเรือนสำเร็จรูป ขนาด 6x6x4 และ 9x6x4 ม.
2. วัสดุเพาะชำ (ทราย, แกลบดิน, ขุยมะพร้าว, ขี้เถ้าแกลบ, เฟอรัสซัลเฟต , คอปเปอร์ซัลเฟต, ซิงค์ซัลเฟต, ปูนยิปซั่ม และปูนมาร์ล
3. ถุงดำ ขนาด 10x20 ซม.
4. ปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0, 16-16-16 และ ปุ๋ยคอก
5. กรงเลี้ยงแมลงขนาด 50x50x100 ซม.
6. กรรไกรธรรมดาและกรรไกรตัดแต่งกิ่ง
7. สำลีและน้ำผึ้ง
8. กล่องพลาสติกเลี้ยงแมลง ขนาด 3x3x2, 8x13.5x5.5, 11x11x7, 15x21x7.5 และ 20x27x11 ซม.

วิธีการ

ได้ดำเนินการการศึกษาการเลี้ยงขยายพันธุ์แตนเบียนทำลายหนอนชอนใบส้ม 3 ชนิด ได้แก่ แตนเบียน *Quadrastichus* sp., *C. ingenuus* และ *A. citricola* ณ โรงเรือนสำเร็จรูปของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนตุลาคม 2543 ถึงเดือนกันยายน 2546 การเลี้ยงขยายพันธุ์แตนเบียนหนอนชอนใบส้มมีการผลิต 3 ขั้นตอน ซึ่งประกอบด้วย

1. การผลิตยอดอ่อนส้ม เพาะเมล็ดส้มโอในถุงดำ ขนาด 10x20 ซม. จำนวน 2 เมล็ด โดยวัสดุที่ใช้เพาะชำ ทำตามคำแนะนำของโครงการป้องกันและกำจัดศัตรูไม้ผลโดยวิธีผสมผสาน ไทย -เยอรมัน ซึ่งมีส่วนผสมต่อ 1 ลบ.ม.ดังนี้ ทราย 20%, แกลบดิน 15%, ขุยมะพร้าว 60%, ขี้เถ้าแกลบ 5%, เฟอรัสซัลเฟต 500 กรัม, คอปเปอร์ซัลเฟต 10 กรัม, ซิงค์ซัลเฟต 10 กรัม, ปูนยิปซั่ม 1,000 กรัม และปูนมาร์ล 500 กรัม

เมื่อกล้าส้มอายุ 1 เดือนใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตรทุก 7 วัน และเมื่อกล้าส้มอายุ 4 เดือน ใส่ปุ๋ยสูตร 16-16-16 สลับกับปุ๋ยคอก 1 ครั้งต่อเดือน เมื่อกล้าส้มอายุประมาณ 6-8 เดือน สามารถนำมาใช้ในการทดลองเลี้ยงหนอนชอนใบส้มได้ โดยตัดให้เหลือความสูงประมาณ 50 ซม. แล้วตัดใบออกประมาณ 70% แล้วใส่ปุ๋ยสูตร 46-0-0 อัตรา 1 ช้อนโต๊ะต่อถุงเพื่อกระตุ้นให้ ต้นส้มแตกใบอ่อน

2. การผลิตหนอนชอนใบส้ม นำต้นส้มที่เตรียมได้จากข้อ 1 จำนวน 10 ต้น (5ถุง) ไปใส่ในกรงเลี้ยงแมลง 50x50x100 ซม แล้วปล่อยผีเสื้อหนอนชอนใบส้มที่เก็บรวบรวมได้จากธรรมชาติ ครั้งละ 50 ตัวต่อกรง ผีเสื้อจะวางไข่และฟักเป็นตัวหนอน สามารถใช้เลี้ยงแตนเบียนได้

3. การเลี้ยงแตนเบียน รวบรวมแตนเบียนตัวเต็มวัยทั้ง 3 ชนิด โดยการเก็บรวบรวมหนอนชอนใบส้มจากธรรมชาติมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อเก็บรวบรวมแตนเบียนที่ฟักออกมาใช้เป็นแม่พันธุ์ในการเลี้ยงขยายพันธ์

3.1 การเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* sp. จะปล่อยแตนเบียนเพศเมียที่ผสมพันธุ์แล้วภายหลังจากการปล่อยผีเสื้อในกรงเลี้ยงหนอนชอนใบส้ม ประมาณ 5 วัน ประกอบกับการสังเกตว่าหนอนชอนใบส้มอยู่ในวัย 2-3 ซึ่งเป็นวัยที่แตนเบียนชนิดนี้ชอบทำลาย

3.2 การเลี้ยงแตนเบียน *C. ingenuus* จะปล่อยแตนเบียนเพศเมียที่ผสมพันธุ์แล้วภายหลังจากการปล่อยผีเสื้อหนอนชอนใบในกรงประมาณ 6-8 วัน ประกอบกับการสังเกตว่าหนอนชอนใบส้มอยู่ในวัย 3 หรือก่อนเข้าดักแด้ ซึ่งเป็นวัยที่แตนเบียนชนิดนี้ชอบทำลาย

3.3 การเลี้ยงแตนเบียน *A. citricola* จะปล่อยแตนเบียนเพศเมียที่ผสมพันธุ์แล้วภายหลังจากการปล่อยผีเสื้อหนอนชอนใบในกรงประมาณ 2-3 วัน ประกอบกับการสังเกตว่าหนอนชอนใบส้มอยู่ในระยะไข่หรือวัย 1 ซึ่งเป็นวัยที่แตนเบียนชนิดนี้ชอบทำลาย

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2543-กันยายน 2546

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองพัฒนารูปแบบการผลิตขยายแตนเบียนทำลายชอนใบส้ม 3 ชนิด แตนเบียน *Quadrastichus* sp, *C.ingenuus* และ *A. citricola* ณ โรงเรือนสำเร็จรูปของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนตุลาคม 2543 ถึงเดือนกันยายน 2546 เพื่อใช้ในการควบคุมหนอน หนอนชอนใบส้มโดยการเลี้ยงในกรงขนาด 50x50x100 ซม. มีผลการทดลอง ดังนี้

1. การเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* sp. โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 25 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม113-436 ตัว (เฉลี่ย 231.22) สามารถทดลองได้ 18 ครั้ง พบว่าหนอนถูกเบียน 0-95.58 % (เฉลี่ย 44.43%) เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 0-100% (เฉลี่ย 90.17) สามารถผลิตแตนเบียนได้ครั้งละ0-108 ตัวต่อกรง (เฉลี่ย 64.19 ตัว) โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 3.98:1

2. การเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* sp. โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 50 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม110-421 ตัว (เฉลี่ย 249.32) สามารถทดลองได้ 20 ครั้ง พบว่าหนอนถูกเบียน 28.66-73.63 % (เฉลี่ย 55.27%) เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 86.49-99.49% (เฉลี่ย 96.08) สามารถผลิตแตนเบียนได้ครั้งละ58-230 ตัวต่อกรง (เฉลี่ย 174.38 ตัว) โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1.69:1

3. การเลี้ยงแตนเบียน *Cirrospilus ingenuus* โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 25 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม 165-359 ตัว (เฉลี่ย 276.83) สามารถทดลองได้ 16 ครั้ง พบว่าหนอนถูกเบียน 0-3.03% (เฉลี่ย 0.25%) เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 0-100% (เฉลี่ย 85.25) สามารถผลิตแตนเบียนได้ครั้งละ0-5 ตัวต่อกรง (เฉลี่ย 0.42 ตัว)

4. การเลี้ยงแตนเบียน *Ageniaspis citricola* สามารถทดลองได้ 1 ครั้ง โดยใช้แตนเบียนเพศเมีย 50 ตัวต่อหนอนชอนใบส้ม 252 ตัว พบว่าหนอนถูกเบียน 42.46 % เปอร์เซ็นการฟักของดักแด้แตนเบียน 99.07% สามารถผลิตแตนเบียนได้ 106 ตัวต่อกรง โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 3.24:1

การเลี้ยงขยายพันธ์แตนเบียนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถทำอย่างต่อเนื่องได้เพราะไม่สามารถทำ stock culture ของแตนเบียนได้ และ ผลผลิตต่อรอบไม่เพียงพอต่อการทำการทดสอบในสภาพไร่

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดลองพัฒนารูปแบบการผลิตขยายแตนเบียนทำลายชอนใบส้ม 3 ชนิด แตนเบียน *Quadrastichus* sp, *C.ingenuus* และ *A. citricola* ณ โรงเรือนสำเร็จรูปของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรุงเทพมหานคร ระหว่างเดือนตุลาคม 2543 ถึงเดือนกันยายน 2546 โดยการเลี้ยงในกรงขนาด 50x50x100 พบว่าสามารถเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* เฉลี่ย 174.38 ตัวตัวต่อกรง สูงสุด 230 ตัวต่อกรง แต่ไม่สามารถทำอย่างต่อเนื่องได้เพราะไม่สามารถทำ stock culture ของแตนเบียนได้ และผลผลิตต่อรอบไม่เพียงพอต่อการทำการทดสอบในสภาพไร่

เอกสารอ้างอิง

รุจ มรกต, และ พิมลพร นันทะ 2545. การเลี้ยงขยายพันธ์แตนเบียนของหนอนชอนใบส้ม น. 551-562 . *ใน* เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 13, 6 – 9 สิงหาคม 2537. โรงแรมโกลเด้นแซนด์ อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

รุจ มรกต, พิมลพร นันทะ และ บังอร สมานอัคนีย์. 2537. การเปลี่ยนแปลงประชากรและเปอร์เซ็นต์การ ถูกทำลายโดยแตนเบียนของหนอนชอนใบส้ม *Phylllocnistis citrella* Stainton ในสวนส้มโอจังหวัดชัยนาท น. 835-846 . *ใน* เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 9, 21 – 24 มิถุนายน 2537. โรงแรมแกรนด์จอมเทียนพาเลซ , ชลบุรี.

รุจ มรกต, พิมลพร นันทะ และ บังอร สมานอัคนีย์. 2539. การเปลี่ยนแปลงประชากรของหนอนชอนใบส้ม และแตนเบียนในสวนส้มเขียวหวาน. น. 451-457 *ใน* เอกสารประกอบการประชุมวิชาการอารักขาพืช แห่งชาติ ครั้งที่ 2. 9-11 ตุลาคม 2538. โรงแรมเพชรงาม, เชียงใหม่.

Argov, Y. and Y. Rossler. 1998. Rearing methods for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton and its parasitoids in Israel. Biological Control. 11: 18-21.

Neale, C., D. Smith, G.A.C. Beattie and M. Miles. 1995. Importation, host specificity, testing, rearing and release of three parasitoids of *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera:Gracillariidae) in eastern Australia. J. Aust.Ent. Soc.34:343-348.

Smith, J. M. and M.A. Hoy. 1995. Rearing methods for *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Cirrospilus quadristriatus* (Hymenoptera: Eulophidae) released in a classical biological control program for the leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). Florida Entomologist. Vol.78. No.4: 601-608 .

Ujiye,T., K. Kamijo and R. Morakote. 1996. Species composition of parasitoids and rate of parasitism of citrus leafminer (CLM), *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera : Gracillaeiidae) in central and northern Thailand, with key to parasitoids of CLM collected from Japan, Taiwan and Thailand. Bull. Fruit Tree Res. Stn. 29 : 79-106 .

ตารางที่ 1 ข้อมูลการทดลองเลี้ยงแตนเบียน *Quadrastichus* sp. *Cirrospilus ingenuus* และ *Ageniaspis citricola* ในกรงขนาด 50x50x100 ซม. ในโรงเรือนสำเร็จรูป กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ เขตจตุจักร กรุงเทพฯระหว่างปี 2544-2546

ชนิด/จำนวนแตนเบียนเพศเมียที่ปล่อยต่อกรง	จำนวนซ้ำ	จำนวนแมลงอาศัยต่อกรง (ต่ำสุด-สูงสุด) เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์เบียน (ต่ำสุด-สูงสุด) เฉลี่ยต่อครั้ง	เปอร์เซ็นการฟักเป็นตัวเต็มวัย (ต่ำสุด-สูงสุด) เฉลี่ยต่อครั้ง	ผลผลิตแตนเบียนต่อกรง(ต่ำสุด-สูงสุด) เฉลี่ยต่อครั้ง	อัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมีย
Quadrastichus sp. /25	18	(113-436) 231.22	(0-95.58) 44.43	(0-100) 90.17	(0-108) 64.19	3.98 : 1
Quadrastichus sp. /50	20	(110-421) 249.32	(28.66-73.63) 55.27	(86.49-99.49) 96.08	(58-230) 174.38	1.69 : 1
Cirrospilus ingenuus /15	16	(165—359) 276.83	(0-3.03) 16.47 $\pm$ 23.43	(0-100) 85.25	(0-5) 0.42	-
Ageniaspis citricola /50	1	252	42.46	99.07	106	3.24 : 1

การพัฒนารูปแบบการผลิต และการใช้แตนเบียนชนิดต่างๆ ในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

Mass Rearing Model of Parasitoids for Controlling Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Kuwayama)

รุจ มรกต และ พิมลพร นันทะ

กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การพัฒนารูปแบบการผลิตแตนเบียน *Tamarixia radiata* ให้ได้ปริมาณมากได้ดำเนินการทดลอง ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2543 เดือน กันยายน 2546 พบว่า การผลิตแตนเบียนในกรงเลี้ยงแมลงขนาดกว้าง 50 ซม. ยาว 50 ซม. สูง 100 ซม. โดยใช้แตนเบียน เพศเมีย 25 ตัวต่อตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม วัย 3-5 จำนวน เฉลี่ย 625.84 ตัวทำการทดลองได้ 758 ครั้ง พบว่าเพลี้ยไก่แจ้ถูกเบียน เฉลี่ย 57.26 % เปอร์เซ็นต์การฟักของแตนเบียน เฉลี่ย 88.30 % ได้แตนเบียนตัวเต็มวัยครั้งละ เฉลี่ย 372.81 ตัว ต่อ กรง โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ ต่อเพศเมีย 0.80:1 โดยสามารถผลิตได้สูงสุด 50 ครั้ง ต่อเดือนในเดือน พฤศจิกายน 2544 ได้แตนเบียน 14,208 ตัว การทดสอบประสิทธิภาพแตนเบียนเพื่อควบคุมประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในสวนส้มเขียวหวาน ได้ดำเนินการ ณ สวนส้มเขียวหวานของเกษตรกร อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยการปล่อยแตนเบียนจำนวน 40 ตัวต่อต้นและ 20 ต้นต่อแปลงทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือน กันยายน 2545 และเก็บข้อมูลประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม 4 ยอด/ต้น และจำนวน 20 ต้น / แปลงและเก็บตัวอ่อนวัย 3 -5 จำนวน 200 -500 ตัวต่อแปลงเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มเปรียบเทียบระหว่างแปลงที่ปล่อยแตนเบียนและไม่ปล่อยแตนเบียน พบว่าค่าเฉลี่ยประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยและไม่ปล่อยเท่ากับ 16.74 ตัวต่อยอดและ 33.02 ตัวต่อยอดตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยและไม่ปล่อยที่ประเมินในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายนพบว่าค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.42 และ 7.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การทดสอบประสิทธิภาพแตนเบียนเพื่อควบคุมประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงต้นแก้วที่ปลูกเป็นไม้ประดับภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร ทำการทดสอบ 6 แปลง โดยมีการปล่อยแตนเบียน 3 แปลงและไม่ปล่อย 3 แปลง โดยปล่อยแตนเบียน จำนวน 10, 20 และ 30 ตัว ต่อ ตารางเมตร ในแปลงที่ 1, 2 และ 3 ทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 44 06 003 009

2545 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2546 ทำการเก็บข้อมูลประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม 3 ตารางเมตรต่อแปลงและเก็บตัวอ่อนวัย 3 -5 จำนวน 100 ตัว ต่อแปลงเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม การเปรียบเทียบพบว่าค่าเฉลี่ยประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ปล่อยแตนเบียนแปลงที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 1333.25, 476.63 และ 760.25 ตัวต่อตารางเมตร ตามลำดับและในแปลงไม่ปล่อยแปลงที่ 4, 5 และ 6 เท่ากับ 140.38, 109.92 และ 243.3 ตัวต่อตารางเมตร ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยแตนเบียน แปลงที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 13.94, 9.42 และ 11.53 ตามลำดับ และในแปลงไม่ปล่อยแปลงที่ 4, 5 และ 6 เท่ากับ 7, 9 และ 4.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

คำนำ

เพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorina citri* Kuwayama (Homoptera: Psyllidae) เป็นแมลงศัตรูสำคัญของส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco) ในประเทศไทย แมลงชนิดนี้นอกจากทำลายส้มเขียวหวานโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากยอดอ่อนของส้ม นอกจากนั้นยังเป็นพาหะนำโรคกรีนนิ่ง ซึ่งเป็นโรคส้มที่ร้ายแรง เพราะสามารถทำให้ต้นส้มทรุดโทรมผลร่วงก่อนเก็บเกี่ยวและตายก่อนถึงเวลาอันสมควร โรคกรีนนิ่งจัดเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกส้มทั่วเอเชีย (Aubert, 1990) แนวทางในการลดการระบาดของโรคกรีนนิ่งมี 2 แนวทาง คือ การลดเชื้อโรคที่ติดไปกับกิ่งพันธุ์เมื่อขยายพันธุ์โดยวิธีการตอนกิ่งและการควบคุมแมลงพาหะ รุจ มรกตและคณะ 2538 พบว่าแตนเบียน *Tamarixia radiata* และ *Diaphorencyrtus aligarhensis* ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมประชากรของเพลี้ยไก่แจ้ส้มในสภาพธรรมชาติ ในหมู่เกาะ Reunion และประเทศไต้หวันได้มีการนำเข้าแตนเบียน *T. radiata* ไปเพาะเลี้ยงและใช้ควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้มอย่างได้ผล Aubert and Quilici; 1984, Chu and Chien; 1991) รุจและคณะ (2539) พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงแตนเบียนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม 2 ชนิด คือ *Tamarixia radiata* และ *Diaphorencyrtus aligarhensis* ได้ โดยมีวงจรการผลิต คือ 1. การผลิตต้นแก้วให้มียอดอ่อนใช้เวลา ประมาณ 12 – 14 วัน 2. การผลิตตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัยสาม ใช้เวลา 10 วัน และการผลิตแตนเบียน *T. radiata* และ *D. aligarhensis* ใช้เวลาประมาณ 15 – 16 วัน สรุปวงจรการผลิตแตนเบียน *T. radiata* และ *D. aligarhensis* ใช้เวลา 33 – 38 วัน และ 37 – 40 วัน โดยได้ผลผลิตเป็นแตนเบียนตัวเต็มวัยเฉลี่ย 37.14 และ 26.33 ตัวต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง ดังนั้นควรมีการพัฒนารูปแบบและจัดการการผลิตแตนเบียนเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยการผลิตสูงขึ้น และผลผลิตต่อรอบอย่างต่ำ 1,000 ตัวเพื่อให้สามารถนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้มในภาคสนามได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กิ่งชำต้นแก้ว
2. ดินผสมสำเร็จ
3. ปุ๋ยยูเรีย
4. ปุ๋ยอินทรีย์
5. กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ซม. สูง 23 ซม.
6. กระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. สูง 7 ซม
7. กรงเลี้ยงแมลงขนาด 50x50x100 ซม.
8. โหลพลาสติกเลี้ยงแมลงขนาดผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 27.5 ซม
9. สำลี
10. น้ำผึ้ง

11. หลอดดูดแมลง

12. เพลี้ยไก่แจ้ส้ม

13 แตนเบียน *T. radiata*

14 กรรไกรตัดแต่งกิ่ง

วิธีดำเนินการ

1. การพัฒนารูปแบบการผลิตแตนเบียน *T. radiata* ให้ได้ปริมาณมาก ดังนี้

1.1. การผลิตต้นแก้วให้มียอดอ่อนเพื่อใช้เลี้ยงเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

นำเอากิ่งชำต้นแก้วปลูกในกระถางพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ซม. สูง 23 ซม.. หลังจากนั้น 60วัน ทำการตัดแต่งทรงพุ่มและให้ปุ๋ยยูเรีย ประมาณ 7 วันต้นแก้วจะแตกยอดอ่อนสามารถนำไปผลิตเพลี้ยไก่แจ้ส้มได้

1.2. การผลิตตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3

เก็บตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มจากต้นแก้วส้มที่ปลูกโดยทั่วไป โดยใช้หลอดดูดแมลงหรือเก็บยอดต้นแก้วที่มีตัวอ่อนวัย 3 มาเลี้ยงไว้ในโหลพลาสติก ทิ้งไว้จนกระทั่งตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มฟักออกมาแล้วจึงใช้หลอดดูดแมลงเก็บรวบรวมตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มเพื่อใช้ในการผลิตตัวอ่อนสำหรับงานทดลอง โดยปล่อยตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้ม 25 คู่ต่อต้นแก้ว 1 ต้น ซึ่งวางไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 50x50x100 ซม.ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง จึงดูดเอาตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มออก ทิ้งไว้ประมาณ 10 วัน ก็จะได้ตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3 ซึ่งเป็นวัยที่เหมาะต่อการเข้าทำลายของแตนเบียน *T. radiata* สามารถนำไปผลิตแตนเบียนได้

1.3. การผลิตแตนเบียน *T. radiata*

ทำการรวบรวมตัวเต็มวัยของแตนเบียน *T. radiata* โดยเก็บยอดต้นแก้วที่มีตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3 – 5 จากแหล่งระบาดมาเลี้ยงในโหลพลาสติกเลี้ยงแมลง ตรวจเช็คแตนเบียน *T. radiata* ที่ฟักออกมาทุกวันแล้วใช้หลอดดูดแมลงดูดเก็บรวบรวมไว้ในกล่องเลี้ยงแมลงขนาด 2.7x2.7x2.3 ซม.กล่องละ 10 ตัว ใส่สำลีชุบน้ำผึ้ง 50 %เพื่อเป็นอาหาร ปล่อยแตนเบียน 25 คู่ ต่อต้นแก้วที่มีเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3 ที่ผลิตได้ในแต่ละกระถางในกรงเลี้ยงแมลง โดยนับจำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นแก้วก่อนปล่อยแตนเบียน หลังจากนั้นประมาณ 5 วันตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ถูกเบียนและกลายเป็นมัมมี่สามารถนับจำนวนได้ ตัดกิ่งต้นแก้วที่มีมัมมี่แล้วนำมารวมกันใช้สำลีหุ้ม ปลายกิ่งด้านหนึ่งปักลงผ่านฝาถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. สูง 5 ซม ซึ่งมีน้ำอยู่ภายใน นำไปวางในโหลพลาสติกเลี้ยงแมลงขนาดผ่าศูนย์กลาง 20 ซม. สูง 27.5 ซม.เพื่อรอให้แตนเบียนตัวเต็มวัยฟักออกมา ใช้หลอดดูดแมลง เก็บรวบรวบแตนเบียนที่ได้ ในแต่ละวัน เก็บในกล่องเลี้ยงแมลงขนาด 2.7x2.7x2.3 ซม.กล่องละ 10 ตัว และใส่สำลีชุบน้ำผึ้ง 50 %เพื่อเป็นอาหาร ตัวเต็มวัยแตนเบียนที่รวบรวมได้สามารถนำไปทดสอบประสิทธิภาพในภาคสนามได้

2. การทดสอบประสิทธิภาพแตนเบียนภาคสนาม

2.1 การทดสอบในสวนส้มเขียวหวาน

ดำเนินการทดลองที่สวนส้มเขียวหวานของเกษตรกร อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี โดยแบ่งสวนส้มออกเป็น 2 แปลง แปลงที่1 มีต้นส้ม 17 แถวๆละ 40 ต้น แปลงที่ 2 มี 14 แถวๆละ 40 ต้น ปล่อยแตนเบียนจำนวน 40 ตัวต่อ ต้นและ 20 ต้นต่อแปลงทุก 2 สัปดาห์ในแปลงที่1 ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2544 ถึงเดือนกันยายน 2545 และเก็บข้อมูลประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม 4 ยอด/ต่อต้นและจำนวน 20 ต้น ต่อแปลงและเก็บตัวอ่อนวัย 3 -5 จำนวน 200 -500 ตัวต่อแปลงเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มเปรียบเทียบระหว่างแปลงที่ปล่อยแตนเบียนและไม่ปล่อยแตนเบียน

2.2 การทดสอบในแปลงต้นแก้วที่ปลูกเป็นไม้ประดับ

ดำเนินการทดลองในแปลงปลูกต้นแก้วภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร ตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2545 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2546 โดยแปลงที่1, 2 และ3 มีพื้นที่ 47, 31 และ 11 ตารางเมตร ทำการปล่อยแตนเบียน 10, 20 และ 30 ตัว ต่อ ตารางเมตรในแปลงที่ 1 ,2 และ 3 ตามลำดับทุก 2 สัปดาห์ แปลงที่ 4, 5, และ 6 มีพื้นที่ 32, 29 และ 11 ตารางเมตร ไม่มีการปล่อยแตนเบียน ทำการเก็บข้อมูลประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มทั้ง 6 แปลงโดย สุ่มเก็บแปลงละ 3 จุดๆละ 1 ตารางเมตรและเก็บตัวอ่อนวัย 3 -5 จำนวน 100 ตัว ต่อแปลง ทุก 2 สัปดาห์เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม เปรียบเทียบระหว่างแปลงที่ปล่อยแตนเบียนและไม่ปล่อยแตน

ผลการทดลอง

1. การพัฒนารูปแบบการผลิตแตนเบียน *T. radiata* ให้ได้ปริมาณมาก

ผลการทดลอง ระหว่างเดือน ตุลาคม 2543 เดือน กันยายน 2546 (ตารางที่ 1) พบว่า การผลิตแตนเบียนในกรงเลี้ยงแมลงขนาดกว้าง 50 ซม. ยาว 50 ซม. สูง 100 ซม. โดยใช้แตนเบียน เพศเมีย 25 ตัวต่อตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3-4 จำนวน เฉลี่ย 625.84 (84-1890) ตัว ทำการทดลองได้ 758 ครั้ง พบว่าเพลี้ยไก่แจ้ถูกเบียน เฉลี่ย 57.26 (4.34-99.54)% เปอร์เซ็นต์การฟักของแตนเบียน เฉลี่ย 88.30 (1.43-100)% ได้แตนเบียนตัวเต็มวัยเฉลี่ยครั้งละ 372.81 (2-1376) ตัวต่อกรง โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 0.80:1 สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง โดยสามารถผลิตได้สูงสุด 50 ครั้ง ต่อเดือน ในเดือน พฤศจิกายน 2544 ได้แตนเบียน 14,208 ตัว

2. การทดสอบประสิทธิภาพแตนเบียน

2.1 การทดสอบในสวนส้มเขียวหวานเพื่อควบคุมประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในสวนส้มเขียวหวาน ได้ดำเนินการ ณ สวนส้มเขียวหวานของเกษตรกร อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรีโดยการปล่อยแตนเบียนจำนวน 40 ตัวต่อต้นและ 20 ต้นต่อแปลงทุก 2 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนเมษายน ถึงเดือน กันยายน 2545 และเก็บข้อมูลประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม 4 ยอดต่อ ต้นและจำนวน 20 ต้นต่อแปลงและเก็บตัวอ่อนวัย 3 -5 จำนวน 200 -500 ตัว

ต่อแปลงเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มเปรียบเทียบระหว่างแปลงที่ปล่อยแตนเบียนและไม่ปล่อยแตนเบียน พบว่าค่าเฉลี่ยประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยและไม่ปล่อยเท่ากับ 16.74 ตัวต่อยอด และ 33.02 ตัวต่อยอด (ตารางที่ 2) เปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยและไม่ปล่อยที่ประเมินในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนกันยายนพบว่าค่าเฉลี่ยเท่ากับ 19.42 และ 7.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

2.2 การทดสอบในแปลงต้นแก้วที่ปลูกเป็นไม้ประดับ

การทดสอบประสิทธิภาพแตนเบียนเพื่อควบคุมประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงต้นแก้วที่ปลูกเป็นไม้ประดับได้ดำเนินการทดลองกับแปลงปลูกต้นแก้วภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร ทำการทดสอบ 6 แปลง เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม การเปรียบเทียบพบว่าค่าเฉลี่ยประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ปล่อยแตนเบียนแปลงที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 1333.25, 476.63 และ 760.25 ตัวต่อ ตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และในแปลงไม่ปล่อยแปลงที่ 4, 5 และ 6 เท่ากับ 140.38, 109.02 และ 243.33 ตัวต่อ ตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยแตนเบียนแปลงที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 13.94, 9.42 และ 11.53 ตามลำดับและในแปลงไม่ปล่อยแปลงที่ 4, 5 และ 6 เท่ากับ 7, 9 และ 4.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. สามารถพัฒนารูปแบบการผลิตแตนเบียน *T. radiata* เป็นปริมาณมากได้โดยใช้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาดกว้าง 50 ซม. ยาว 50 ซม. สูง 100 ได้แตนเบียนตัวเต็มวัยเฉลี่ยครั้งละ 372.81ตัวต่อกรงสูงสุด 1376 ตัวต่อกรง โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ ต่อเพศเมีย 0.80:1 สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง โดยสามารถผลิตได้สูงสุด 50 ครั้ง ต่อเดือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพแตนเบียนพบว่าสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเบียนและลดประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในสภาพธรรมชาติได้ระดับหนึ่งเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

รุจ มรกต และพิมลพร นันทะ. 2538. ประสิทธิภาพของแตนเบียนทำลายเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorins citri* Kuwayama เอกสารประกอบการประชุมวิชาการการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2, 9 – 11 ตุลาคม 2538. เล่มที่ 2. หน้า 458-.463

รุจ มรกต บังอรสมานอัคนีย์ และพิมลพร นันทะ. 2539. เทคนิคการเลี้ยงขยายพันธ์แตนเบียนทำลายเพลี้ยไก่แจ้ส้ม เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 24-28 มิถุนายน 2539. หน้า 719-729.

Aubert B. 1990. Integrated activities for the control of Huanglunbin – Greening and its vector *Diaphorina citri* Kuwayama in Asia In : Retabilitation of citrus industry in Asia Pacific Region. Edited by Aubert B., S. Tontyaporn and D. Buansuwan. Proceeding of the Asia Pacific International Conference of Citriculture. Pp. 133 – 144.

Aubert B. and S. Quilici; 1984. Biological\control of the African and Asian citrus psyllids (Homoptera:Psylloidea), through eulophid and encyrtid parasites (Hymenoptera: Chalcidoidea) in Reunion Island. In: Garnsey S.M., L.M. Timmer and J.A. Dodds. Eds. Proceeding s of the 9th Conference of the international of citrus Virologists. University of California, Riversde, USA: IOVC, 100-108.

Chu Y.I. and C.C. Chien. 1991. Utilization of natural enemies to control psyllid vectors transmitting citrus greening. Integrated control of plant virus diseases. Proceedings of the International Workshop TARI, Taichung, Taiwan, April 9-14, 1990 (edited by Kiritani, K., Su, H, Chu, Y. I.) Taipe, Taiwan, Food and fetilizer Technology Ceter for Asian and Pacific Region, 135-145.

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเลี้ยงแตนเบียน *Tamarixia radiata* ทำลายเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ณ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ ระหว่างปี 2544 - 2546

เดือน / ปี	จำนวนครั้ง	จำนวนเฉลี่ยของตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ต่อกรง	เปอร์เซ็นต์การเบียนเฉลี่ย	จำนวนเฉลี่ยแตนเบียนที่ได้ต่อกรง	อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย
ต.ค. 43 - ก.ย. 44	103	727.72	59.43	380.31	0.98:1
ต.ค. 44 - ก.ย. 45	325	504.60	47.08	226.25	0.98:1
ต.ค. 45 - ก.ย. 46	330	645.24	65.26	512.12	0.75:1
	758	625.84	57.26	372.81	0.08 1

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยแตนเบียน *Tamaxrixia radiata* และแปลงที่ไม่ได้ปล่อย ณ สวนส้มเขียวหวานของเกษตรกร อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

ครั้งที่	วันที่	แปลงที่ปล่อยแตนเบียน (ค่าเฉลี่ยจำนวนตัว /ยอด)				แปลงที่ไม่ได้ปล่อยแตนเบียน (ค่าเฉลี่ยจำนวนตัว / ยอด)			
		ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม	ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม
1	2/4/45	13.40	6.15	0.85	20.40	11.50	41.50	0.65	53.65
2	18/4/45	8.60	21.35	1.20	31.15	10.65	19.35	1.80	31.80
3	30/4/45	13.40	9.90	1.30	24.60	31.35	14.20	1.55	47.10
4	14/5/45	3.60	13.40	0.75	17.75	15.10	23.50	3.10	41.70
5	28/5/45	11.20	4.50	1.40	17.10	14.00	12.25	2.45	28.70
6	12/6/45	15.90	1.00	1.50	18.40	25.80	23.60	3.40	52.80
7	25/6/45	4.30	5.75	0.45	10.50	4.60	14.25	2.75	21.60
8	9/7/45	4.45	4.20	1.40	10.05	10.85	9.00	1.25	21.10
9	22/7/45	4.00	2.10	0.45	6.55	6.40	2.70	0.50	9.60
10	16/9/45	3.40	5.10	2.35	10.85	8.95	11.20	2.00	22.15
เฉลี่ย		8.23	7.35	1.17	16.74	13.92	17.16	1.95	33.02

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การถูกเบียนของตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงที่ปล่อยแตนเบียน *Tamarixia radiata* และแปลงที่ไม่ได้ปล่อยแตนเบียน ณ สวนส้มเขียวหวานของเกษตรกร อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

วัน/เดือน/ปี	แปลงที่ปล่อยแตนบียน		แปลงที่ไม่ได้ปล่อยแตนเบียน	
	จำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่เก็บ	เปอร์เซ็นต์การเบียน	จำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่เก็บได้	เปอร์เซ็นต์การเบียน
2-4-45	300	51.67	200	13
18-4-45	300	25	300	9
30-4-45	200	60	200	18.5
14-5-45	200	5.5	200	4
28-5-45	100	31	100	13
12-4-45	200	6	200	2.5
25-6-45	200	0.5	200	1.5
9-7-45	200	5	200	3
22-7-45	100	5	100	4
16-9-45	200	4.5	200	2.5
	เฉลี่ย	19.42	เฉลี่ย	7.1

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงต้นแก้วที่ปล่อยแตนเบียนแปลงทดลองที่ 1, 2 และ 3 ภายในบริเวณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ครั้งที่	วันที่	แปลงทดลองที่ 1 ปล่อยแตน 10 ตัว / ตรม. พ.ท. 47 ตรม. = 470 ตัว				แปลงทดลองที่ 2 ปล่อยแตน 20 ตัว / ตรม. พ.ท. 31 ตรม. = 620 ตัว				แปลงทดลองที่ 3 ปล่อยแตน 30 ตัว / ตรม. พ.ท. 11 ตรม. = 330 ตัว			
		ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม	ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม	ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม
1	22/11/46	62	440	16	518	113	15	28	156	89	59	23	171
2	4/12/46	0	33	144	177	10	0	16	26	290	42	44	376
3	18/12/46	0	2	98	100	174	246	17	437	220	13	29	262
4	3/1/46	394	929	57	1380	65	0	10	75	0	62	7	69
5	15/1/46	27	242	165	434	384	333	100	817	353	134	28	515
6	29/1/46	58	33	28	119	98	35	82	215	6	33	15	54
7	12/2/46	4050	1	431	4482	45	650	181	876	545	23	33	601
8	26/2/46	440	1730	620	2790	460	96	34	590	55	410	64	529
9	12/3/46	1880	0	454	2334	1080	0	86	1166	870	4	76	950
10	26/3/46	820	280	117	1217	2230	0	168	2398	1360	2050	72	3482
11	9/4/46	1180	235	403	1818	280	1105	120	1505	4150	475	108	4733
12	23/4/46	110	495	142	747	0	4	42	46	115	38	39	192
13	7/5/46	3900	0	760	4660	430	0	46	476	760	11	98	869
14	21/5/46	1300	400	410	2110	50	44	13	107	0	0	0	0
15	10/6/46	48	4	22	74	46	5	12	63	76	0	60	136
16	26/6/46	4250	1595	486	6331	190	7	95	292	325	107	41	473
17	9/7/46	5	3	42	50	320	176	65	561	4100	47	154	4301
18	24/7/46	950	545	93	1588	0	3	24	27	15	1	2	18
19	6/8/46	0	59	61	120	480	26	11	517	0	0	15	15
20	21/8/46	50	0	27	77	145	6	23	174	0	5	2	7
21	3/9/46	68	117	40	225	55	115	19	189	0	0	14	14
22	17/9/46	35	225	58	318	200	45	42	287	145	7	25	177
23	1/10/46	0	10	252	262	330	45	25	400	265	3	22	290
24	15/10/46	30	18	19	67	11	22	6	39	0	7	5	12
เฉลี่ย		819.04	308.17	206.04	1333.25	299.83	124.08	52.71	476.63	572.46	147.13	40.67	760.25

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในแปลงต้นแก้วที่ไม่มีการปล่อยแตนเบียน ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ครั้งที่	วันที่	แปลงทดลองที่ 4 พื้นที่ 30 ตรม.				แปลงทดลองที่ 5 พื้นที่ 29 ตรม.				แปลงทดลองที่ 6 พื้นที่ 11 ตรม.			
		ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม	ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม	ไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	รวม
1	22/11/46	10	6	6	22	7	0	2	9	115	15	24	154
2	4/12/46	170	20	11	201	5	0	4	9	50	0	16	66
3	18/12/46	0	0	11	11	76	20	26	122	0	0	8	8
4	3/1/46	35	10	8	53	175	18	8	201	80	6	7	93
5	15/1/46	15	0	3	18	124	65	15	204	346	35	55	436
6	29/1/46	13	11	26	50	14	10	30	54	46	18	43	107
7	12/2/46	450	56	60	566	10	2	15	27	320	67	69	456
8	26/2/46	110	32	39	181	5	0	2	7	160	123	52	335
9	12/3/46	95	2	24	121	5	0	3	8	240	3	51	294
10	26/3/46	75	0	19	94	110	0	16	126	320	15	40	375
11	9/4/46	90	0	20	110	235	5	8	248	165	0	72	237
12	23/4/46	15	5	17	37	0	1	3	4	0	4	14	18
13	7/5/46	0	0	3	3	95	0	16	111	110	20	23	153
14	21/5/46	145	1	18	164	0	4	2	6	300	23	18	341
15	10/6/46	10	0	12	22	45	1	7	53	59	0	19	78
16	26/6/46	490	2	36	528	80	1	2	83	482	22	37	541
17	9/7/46	0	0	11	11	460	139	39	638	700	36	9	745
18	24/7/46	440	168	40	648	0	0	2	2	0	0	3	3
19	6/8/46	45	5	8	58	290	0	3	293	480	0	55	535
20	21/8/46	0	0	4	4	30	5	0	35	305	58	3	366
21	3/9/46	23	3	19	45	44	10	11	65	27	28	3	58
22	17/9/46	260	3	13	276	40	115	11	166	0	0	6	6
23	1/10/46	115	0	22	137	0	0	54	54	380	12	14	406
24	15/10/46	0	2	7	9	35	65	13	113	3	13	13	29
เฉลี่ย		108.58	13.58	18.21	140.38	78.54	19.21	12.17	109.92	195.33	20.75	27.25	243.33

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเบียนของแตนบียน *Tamarixia radia* จากการสุ่มเก็บตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม วัย 3-5 จำนวน 100 ตัว ในแปลงที่ปล่อยแตนเบียนอัตรา 10, 20 และ 30 ตัวต่อตารางเมตร ในแปลงทดลองที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ณ แปลงต้นแก้ว ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

เปอร์เซ็นต์การเบียนในแปลงที่ปล่อยแตนเบียนแปลงทดลองที่						เปอร์เซ็นต์การเบียนในแปลงที่ไม่ได้ปล่อยแตนเบียนแปลงทดลองที่					
1		2		3		4		5		6	
ว/ด/ป	% เบียน	ว/ด/ป	% เบียน	ว/ด/ป	% เบียน	ว/ด/ป	% เบียน	ว/ด/ป	% เบียน	ว/ด/ป	% เบียน
22/11/45	0	12/8/45	2	22/11/45	4	12/2/46	18	9/7/46	12	12-246	3
4/12/45	24	3/1/46	13	4/12/45	12	24/7/46	2	17/9/46	6	26/2/46	11
3/1/46	2	15/1/46	39	18/12/45	0	26/11/46	1	**เฉลี่ย**	**9**	12/3/46	3
15/1/46	61	29/1/46	1	3/1/46	7	**เฉลี่ย**	**7**			7/5/46	9
29/1/46	2	12/1/46	7	15/1/46	21					21/5/46	0
12/2/46	6	26/2/46	19	29/1/46	2					26/6/46	3
26/2/46	9	9-4-46	0	12/2/46	3					21/8/46	0
12/3/46	3	21/5/46	0	26/2/46	25					**เฉลี่ย**	**4.14**
26/3/46	18	9/7/46	15	12/3/46	30						
9/4/46	10	24/2/46	2	26/3/46	18						
23/4/46	16	3/9/46	8	9/4/46	34						
7/5/46	12	17/9/46	7	23/4/46	3						
21/5/46	19	**เฉลี่ย**	**9.42**	7/5/46	1						
26/6/46	7			26/6/46	13						
24/7/46	6			12/11/46	0						
6/8/46	9			**เฉลี่ย**	**11.53**						
3/9/46	22										
17/9/46	25										
เฉลี่ย	**13.94**										

การตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์เซลล์แมลงศัตรูพืชด้วยวิธี Isozyme analysis

Isozyme analysis test for Identification of Insect cell lines

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข พิมลพร นันทะ

กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

บทคัดย่อ

การตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์เซลล์แมลงศัตรูพืชด้วยวิธี Isozyme analysis ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ ระหว่าง เดือนตุลาคม 2543 ถึง เดือนกันยายน 2546 เมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาตรวจวิเคราะห์ลักษณะสายพันธุ์เซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยเครื่อง Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Enzyme reagent ชนิด Phosphoglucose isomerase (PGI) พบว่า ลักษณะการเคลื่อนที่ของเอ็นไซม์บน agarose gel ของ *Spodoptera litura* cell line เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร Grace medium และ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TC 100 มีระยะการเคลื่อนที่ เท่ากับ 6 มิลลิเมตร เท่ากัน และ *Spodoptera frugiperda* cell line เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร Grace medium และ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TC 100 มีระยะการเคลื่อนที่เท่ากับ 9 มิลลิเมตร เท่ากัน ทั้ง 2 ซ้ำของการทดลอง แสดงว่า วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิด ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต่างชนิดกันได้ โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกัน ซึ่งข้อมูลการทดลองนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ที่จะดำเนินการเพาะเลี้ยงต่อไป และ ใช้เป็นข้อมูลในการตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เซลล์ที่มีอายุการเพาะเลี้ยงระยะยาวที่ต่างกันได้อีกด้วย

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 4306003007

คำนำ

เซลล์แมลง (Cells line) ที่เพาะเลี้ยงมาจากแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ จะมีลักษณะทางด้านสรีระวิทยา (Morphology) ที่เหมือนๆ กัน ดังนั้น จึงมีการตรวจวิเคราะห์ Cell line ด้วยวิธี Isozyme analysis (Tabachnick and Knudson. 1980, Hay. 1988, Nims and et al. 1998) เพื่อใช้จำแนกชนิด บันทึกลักษณะสายพันธุ์เซลล์แมลงเพาะเลี้ยงที่แน่นอนชัดเจน ซึ่งวิธีนี้จะเป็นการตรวจสอบความผิดปกติของ Cells lines ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะๆ ว่าเกิดการกลายพันธุ์ (Mutation)หรือไม่อีกด้วย (สุชลวัจน์. 2539) ซึ่งจะทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการกำหนดข้อมูลมาตรฐานของเซลล์เพาะเลี้ยง ก่อนที่จะนำ Cells lines ไปใช้ประโยชน์ในการทำการวิจัยต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำ Cells lines ไปใช้ในการวิจัยการผลิตเชื้อไวรัสโรคของแมลง จะต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ Cells lines ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งจะสามารถทราบได้จากวิธีการตรวจสอบนี้ ในงานวิจัยการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสายพันธุ์ไทยได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักตั้งต้น (Primary explant) จากตัวอ่อน (Embryo) และเพาะเลี้ยงได้มีการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ได้เป็น Cells line จำนวน 1 Cells line ซึ่งใช้เวลาในเพาะเลี้ยงให้อาหารทุก 4-5 วันเป็นเวลา 1 ปี จากนั้นจึงนำมาใช้ทดสอบการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ เพื่อให้ทราบถึงลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์เซลล์หนอนกระทู้ผัก เพื่อใช้กำหนดเป็นมาตรฐานการตรวจวิเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง และ เก็บเป็นฐานข้อมูลทางวิชาการด้านเซลล์และโมเลกุล ก่อนที่จะนำเซลล์เพาะลี้ยงไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่าง เช่น Cells lines ชนิดต่างๆ, หลอดหยดสาร (Micro syringes), หลอด Centrifuge, ถาดใส่น้ำแข็งบด, Micropipette เป็นต้น

2. สารเคมีที่จำเป็น เช่น Enzyme stabilizer, Electrophoresis buffer, Cell extraction buffer, Agarose gel, Binding buffer, washing buffer, Solution buffer เป็นต้น

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น Agarose gel electrophoresis, เครื่องปั่นแยกสาร , ตู้ควบคุมอุณหภูมิ , ตู้ปลอดเชื้อ, water bath เป็นต้น

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายเคมีต่าง ๆ ที่ต้องใช้ในการตรวจสอบ ได้แก่ Enzyme reagent ชนิด Phosphoglucose isomerase (PGI) EC number 5.3.1.8, Enzyme stabilizer, Electrophoresis buffer SAB 8.6, Cell extraction buffer SAB 8.6, Agarose gel SAB 8.6 , Binding buffer, washing buffer, Solution buffer

2. เตรียม Cells lines ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic techniques) และ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์สากล (Freshneg, 1983.) โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ *Spodoptera frugiperda* และ

Spodoptera litura ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยง 2 สูตร คือ Grace medium และ TC 100 ภายใต้ปัจจัยสภาพแวดล้อมอื่นๆที่เหมือนกัน (Grace. 1962, สุชลวัจน์ และคณะ. 2543)

3.นำตัวอย่าง Cells lines ที่เตรียมไว้หยดลงบนแผ่น Agarose gel จากนั้นนำเข้าเครื่องตรวจลักษณะเอ็นไซม์ และนำเข้าตู้บ่ม (Incubator) ตามขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ (ภาคผนวกที่ 1.)

4 บันทึกผลบนแผ่นเจลสำเร็จรูป และภาพถ่าย และ บันทึกรายละเอียดลักษณะสายพันธุ์ Cells lines และข้อมูลเบื้องต้นอย่างเป็นระบบ

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการ

ทำการทดลองวิจัย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2544 ถึงเดือนกันยายน 2546 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะสายพันธุ์เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเครื่อง Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Enzyme reagent ชนิด Phosphoglucose isomerase (PGI) พบว่า ลักษณะการเคลื่อนที่ของเอ็นไซม์บน agarose gel ของ *Spodoptera litura* cell line เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร Grace medium และ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TC 100 มีระยะการเคลื่อนที่ เท่ากับ 6 มิลลิเมตร เท่ากัน และ *Spodoptera frugiperda* cell line เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร Grace medium และ เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TC 100 มีระยะการเคลื่อนที่ เท่ากับ 9 มิลลิเมตร เท่ากัน ทั้ง 2 ซ้ำของการทดลอง (ภาพที่ 1.)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ลักษณะสายพันธุ์เซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเครื่อง Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Enzyme reagent ชนิด Phosphoglucose isomerase (PGI) สามารถใช้ตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิด ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต่างชนิดกันได้ โดยไม่จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดเดียวกัน ซึ่งข้อมูลการทดลองนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ ที่จะดำเนินการเพาะเลี้ยงต่อไป และ ใช้เป็นข้อมูลในการตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์เซลล์ที่มีอายุการเพาะเลี้ยงระยะยาวที่ต่างกันได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต . 2539 .ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงเพื่อการเกษตร . **วารสารกีฏและสัตววิทยา** 18(4) : 250-253

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต, อุทัย เกตุนุติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV, น. 447-458. *ใน* **เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช** ครั้งที่ 12 ประจำปี 2543 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 28-31 มีนาคม 2543 ณ โรงแรมอมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี. ISBN 974-7466-50-3

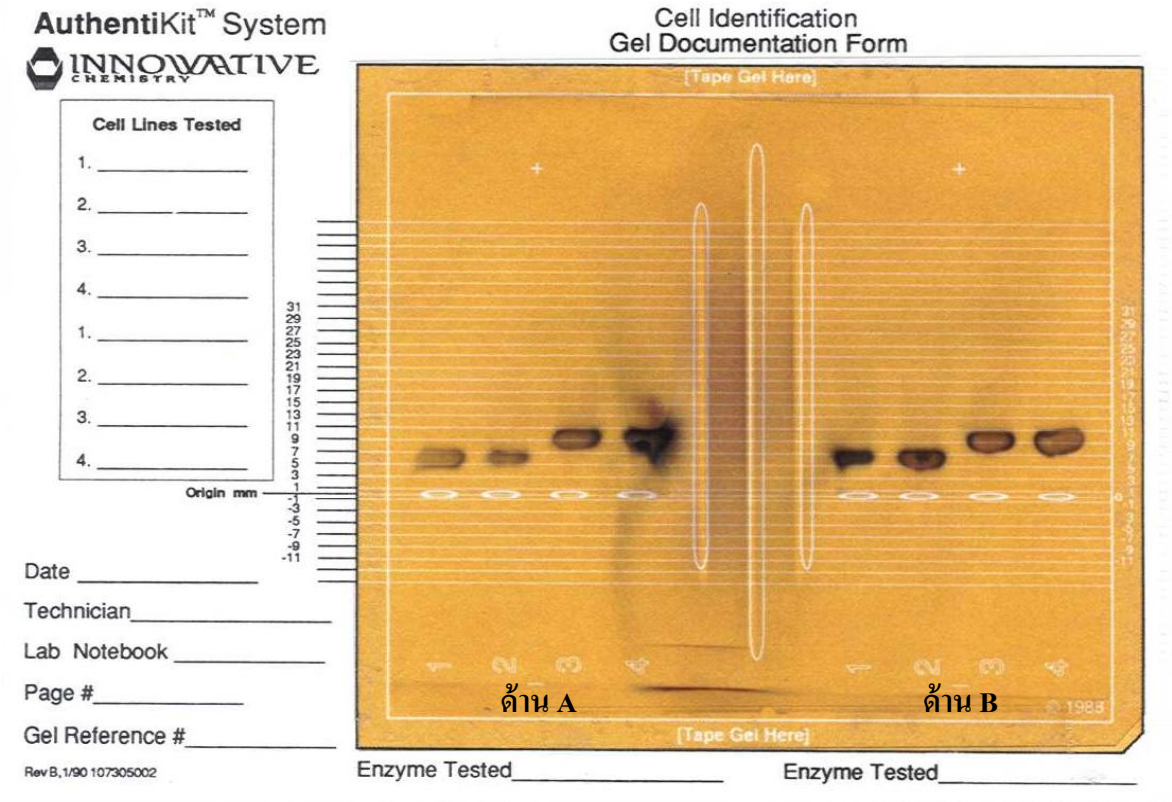
Freshneg, R.Iran 1983. Culture of animal cells A manual of basic technique. Department of clinical Oncology cancer research campaign laboratories University of Glasgow Alan R. Liss., Inc., New York. 285 p.

Grace, T.D.C. 1962. Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *In vitro*. Nature 195:788-789.

Hay; R.J., 1988. The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical biochemistry 171, 225-237.

Nims, R.w., Adam P. Shoemaker, Marcie A. Bauernschub, Laura J.Rec, and John W. Harbell. 1998. Sensitivity of isozyme analysis for the detection of interspecies cell line cross-contamination. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal 34 : 35-39

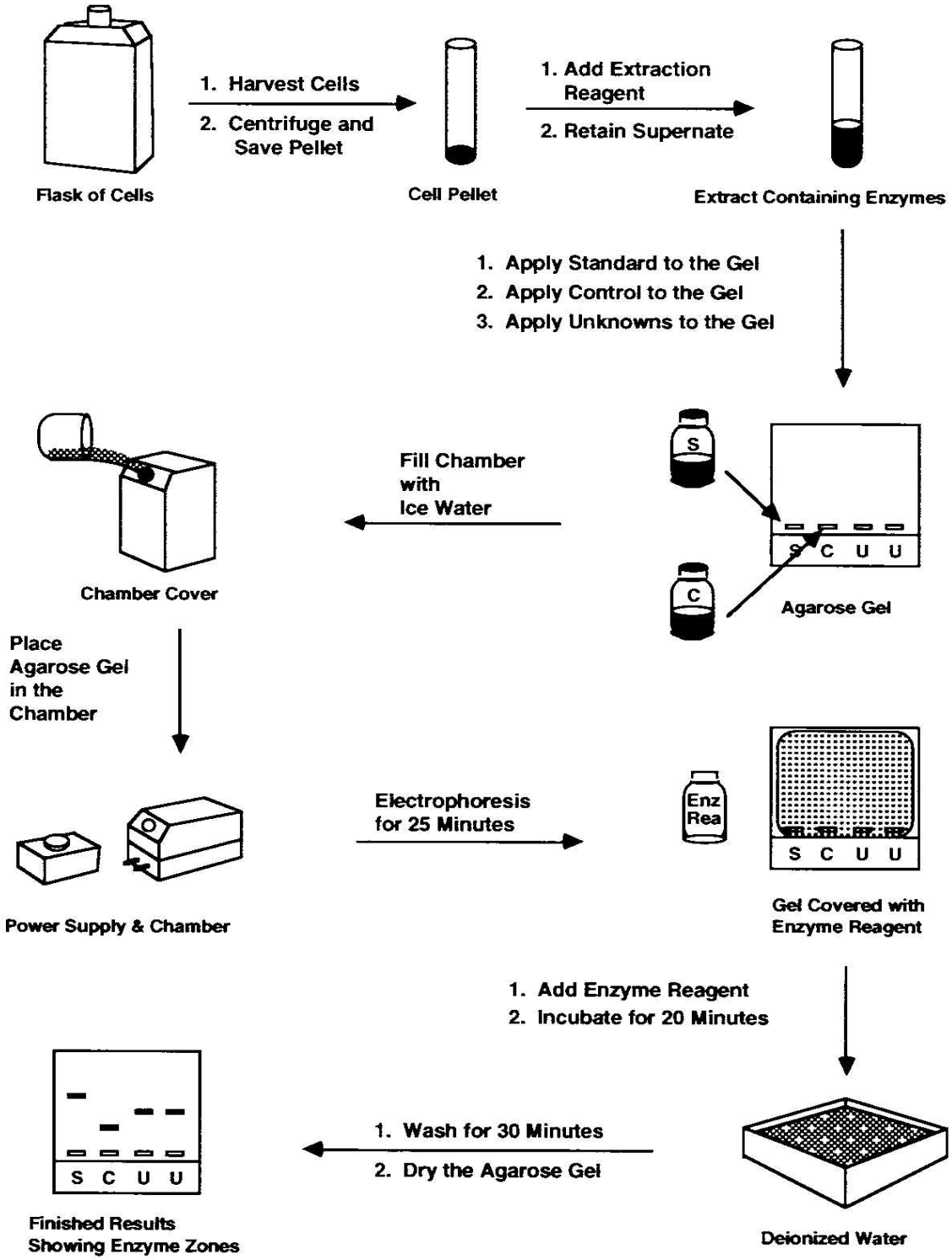
Tabachnick, W.J. and D.L.Knudson. 1980. Characterization of invertebrate cell lines. II Isozyme Analyses Employing starch gel electrophosis. In Vitro 16(4) : 392-398.



ภาพที่ 1. ลักษณะการเคลื่อนที่ของเอ็นไซม์บน agarose gel โดย ด้าน A ช่องที่ 1 คือ *Spodoptera litura* cell line เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร Grace medium และ ช่องที่ 2 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TC 100 มีระยะการเคลื่อนที่ เท่ากับ 6 มิลลิเมตรเท่ากัน ช่องที่ 3 คือ *Spodoptera frugiperda* cell line เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร Grace medium และ ช่องที่ 4 เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TC 100 มีระยะการเคลื่อนที่ เท่ากับ 9 มิลลิเมตรเท่ากัน และด้าน B เป็นการทดลองซ้ำ ซึ่งได้ผลการทดลองเหมือนกัน

ภาคผนวกที่ 1

ขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์เซลล์แมลงด้วยวิธี Isozyme analysis



แบบ ต 1 ก

รายงานผลการปฏิบัติงานวิจัยตามรายกิจกรรม ประจำปี 2546

45	06003	006

46/สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช/กลุ่มกีฏและสัตววิทยา/กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

1. ชื่อแผนงานหลัก 4.1 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันและกำจัดโรคพืช แมลงศัตรูพืชและวัชพืช ตลอดจนการใช้ปุ๋ยและสารเคมีทางการเกษตร

2. ชื่อกรอบโครงการวิจัย 4.1.5 การวิจัยสารสกัดจากพืชและสารชีวภาพ เพื่อทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

3. ชื่อกิจกรรม การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา และ ประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ ของจุลินทรีย์โรคของแมลง

4. ชื่อการทดลอง การทดสอบประสิทธิภาพเซลล์หนอนกระทู้ผักเพาะเลี้ยงในการสร้างผลึกโปรตีน SlNPV

Efficiency test of *Spodoptera litura* Fabricius Cell Line for SlNPV

5. พืช/สาขาวิชา/สาขาวิชาย่อย **วิทยาการเฉพาะด้าน**

6. ประเภทงานวิจัย **งานวิจัยพื้นฐานและประยุกต์**

7. ผู้ดำเนินงาน

หัวหน้า สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต

ผู้ร่วมงาน วัชรี สมสุข พิมลพร นันทะ

9. ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2545 สิ้นสุด กันยายน 2547

10. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพเซลล์หนอนกระทู้ผักในการสร้างผลึกโปรตีน SlNPV ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ ระหว่าง เดือนตุลาคม 2545 ถึง เดือนกันยายน 2546 ด้วยงบประมาณที่จำกัด ทั้งค่าวัสดุและอัตรากำลัง จึงดำเนินการเพาะเลี้ยงรักษาสายพันธุ์เซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบ 2 cell lines ได้แก่ *Spodoptera litura* cell line และ *Spodoptera frugiperda* cell line รวมถึงการเตรียมอนุภาคไวรัสของ ไวรัส Nucleopolyhedrovirus โรคของหนอนกระทู้ผัก เพื่อใช้ในการทดสอบในปีงบประมาณ 2547 ถัดไป ผลงานทดลองวิจัยคิดเป็น 50% ของแผนงานวิจัยการทดลองเรื่อง

11.คำค้น เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง , Insect , Cells culture, Nucleopolyhedrovirus, SlNPV, *Spodoptera litura*

ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของไวรัส *Helicoverpa armigera* NPV กับหนูนอรเว *Rattus norvegicus* สายพันธุ์ Wistar

Acute Toxicity of *Helicoverpa armigera* Nuclear Polyhedrosis Virus In Wistar Rat, *Rattus norvegicus*

กรแก้ว เสือสะอาด **ปราสาททอง พรหมเกิด**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย กับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์อายุ1เดือน โดยให้สาร แขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะโดยใช้เข็มฉีดยาปลายทู่ กับหนูตัวละ 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 2 กลุ่มๆละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) และให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบจำนวน 20 ตัว โดยวิธีการเดียวกัน ผลการทดสอบ ไม่มีหนูตายในกลุ่มให้ไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายและกลุ่มเปรียบเทียบ ภายในระยะเวลา 60 วัน และไม่มีความผิดปกติในด้านพฤติกรรม น้ำหนัก การกินอาหารของกลุ่มทดสอบและกลุ่มเปรียบเทียบ

การศึกษาการเกิดอาการโรคกับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์อายุ 1 เดือน โดยให้สาร แขวนลอยเชื้อไวรัส อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะ โดยใช้เข็มฉีดยาปลายทู่กับหนูตัวละ 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) และให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบ จำนวน 20 ตัว โดยวิธีการเดียวกัน ดูผลการตาย และความผิดปกติของหนูภายในระยะเวลา 14 วัน ผลการทดสอบ ไม่มีหนูตายในกลุ่มให้เชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย และกลุ่มเปรียบเทียบ ไม่มีความผิดปกติในพฤติกรรม การกินอาหารของกลุ่มทดสอบและกลุ่มเปรียบเทียบ

การศึกษา ความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังของเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย กับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน กลุ่มละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) โดยโกนขนบริเวณด้านบนของส่วนหลังทั้ง 2 ด้านๆละ 2 ตารางเซนติเมตร โดยกลุ่มที่ 1 หยดสารแขวนลอย (polyhedra) ผลึกไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตรและกลุ่มที่ 2 หยด อนุภาคไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่หลุดออกจากโปรตีนที่หุ้มแล้ว (free virus rods) ด้านละ 0.1 มิลลิลิตร สำหรับกลุ่มเปรียบเทียบหยดน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ ด้านละ 0.1 มิลลิลิตร

รหัสทะเบียนวิจัย 45 06 012 004

ผลการทดสอบไม่มีความผิดปกติกับผิวหนัง พฤติกรรม น้ำหนัก และการกินอาหาร ของหนูกลุ่มที่ได้รับเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทั้ง 2 กลุ่ม และกลุ่มเปรียบเทียบ

การศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ของหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยขบวนการไมโครเทคนิคและย้อมสีดูเซลล์ของอวัยวะต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าเนื้อเยื่อชั้นบุผิว เนื้อเยื่อใต้ชั้นบุผิว กล้ามเนื้อของกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ นิวเคลียส และไซโตพลาสซึมของตับ , เซลล์ผนังหลอดเลือดฝอย เซลล์เม็ดเลือดแดงในโกลเมอรูรัส และเยื่อบุผิวของท่อไต , เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์เม็ดเลือดแดงในกลุ่มต่อมน้ำเหลืองในม้าม เซลล์เยื่อบุผิวถุงลมปอด เซลล์ผนังหลอดเลือดฝอยที่ผนังถุงลม และเซลล์เม็ดเลือดแดงในปอด หัวใจและกล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน เซลล์ในระยะเจริญเติบโตต่างๆ ของเชื้ออสุจิ ในท่อผลิตเชื้ออสุจิ เซลล์ผลิตฮอร์โมน และไซโตพลาสซึมในท่อพักอสุจิส่วนท้าย และพบอสุจิจำนวนมากของหนูที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย และกลุ่มเปรียบเทียบไม่แตกต่างกัน

คำนำ

ปัจจุบันระบบการค้าเสรี ภายใต้ข้อตกลงขององค์การการค้าโลก (WTO) เรื่องมาตรฐานของสารพิษตกค้างต้องมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยที่สุด และประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชสูงมาก การใช้อย่างไม่ถูกต้อง จึงเกิดปัญหาพิษภัยของการใช้ ผลกระทบต่อมนุษย์ สัตว์ สิ่งแวดล้อม รวมทั้งเกิดการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืช ในผลิตผลเกษตรที่ส่งออกไปยังประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ซึ่งประเทศเหล่านี้ได้ใช้มาตรการสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช มาเป็นตัวกีดกันทางการค้า ดังนั้นในแผนพัฒนาเศรษฐกิจ และสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 จึงมีนโยบายทางการเกษตรเกี่ยวกับการป้องกันกำจัดศัตรูพืช 3 ประการคือ 1. การสนับสนุนการผลิตสินค้าเกษตรปลอดสารพิษ 2. สนับสนุนการลดการใช้สารกำจัดศัตรูพืชโดยเพิ่มทางเลือก 3. ทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่นการใช้สารสกัดจากพืช และสารจุลินทรีย์ต่าง ๆ เช่น การใช้เชื้อไวรัสนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัส มาควบคุมแมลงศัตรูพืชบางชนิด เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย ที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชผัก ผลไม้ หลายชนิด เนื่องจากความเจาะจงต่อแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย มีความปลอดภัยสูงต่อมนุษย์มีฤทธิ์ตกค้างสั้น จึงได้มีการนำเชื้อไวรัสไปใช้ในวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน เพื่อมุ่งเน้นให้ได้ผลผลิตสูง มีคุณภาพได้กำไร ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ลดการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืช และเกษตรกรยอมรับไปใช้

อุทัยและคณะ (2540) ได้มีการผลิตและเลี้ยงไวรัสทั้ง 3 ชนิด คือ *Se*NPV, *Sl*NPV และ *Ha*NPV นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในสภาพไร่ได้มากกว่า 10 ชนิด เช่นฝ้าย กะหล่ำปลี ข้าวโพด มะเขือเทศ หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น อุทัย และคณะ (2544) ได้มีการนำเชื้อไวรัส *Ha*NPV ไปใช้ควบคุมหนอนเจาะสมอ

ฝ้ายร่วมกับการปล่อยแตนเบียน *Trichogramma confusum* ในโครงการ IPC ฝ้าย ในปี 2528-2544 ในพื้นที่ 6 จังหวัดคือ นครสวรรค์ ลพบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา สระแก้ว อุทัยธานี ทำให้ลดการใช้สารเคมีตลอดฤดูปลูกได้ 4-6 ครั้ง และยังนำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูอ่อน พบว่าสามารถทดแทนสารฆ่าแมลงได้ (วิทย์และคณะ, 2540, สมชัยและคณะ, 2543) ได้นำเชื้อไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย ผสมกับสารฆ่าแมลง ไซฟลูทรินหรือ เอ็นโดซัลแฟน เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย หรือการนำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูหอมแดง เมื่อมีความเป็นไปได้สูง ในการนำไวรัส เอ็นพีวีชนิดนี้ไปใช้ในรูปของสารจุลินทรีย์กำจัดแมลงในสภาพไร่ จำเป็นต้องให้เกิดความแน่ใจว่า ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย และยังไม่มีการทดสอบความปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในการทดสอบผลกระทบของไวรัสดังกล่าว ต่อสัตว์เลือดอุ่น โดยใช้หนูนอรเวสายพันธุ์

วิสตาร์ เป็นตัวแทนในการทดลอง เพื่อให้แน่ใจว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์ มีการยอมรับของเกษตรกรในการใช้สารชีวินทรีย์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ลดอันตรายต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และ ลดปัญหาพิษตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืชในผลิตผลเกษตรส่งออกอย่างปลอดภัย

วิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์

1.1 กรงทดลองหนูขนาด 16x28x12 นิ้ว และกรงเลี้ยงหนู

1.2 หนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ (*Rattus norvegicus*)

1.3 เชื้อไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Ha*NPV) อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ที่ผลิตโดย คุณอุทัย เกตุนุติ กลุ่มงานวิจัย การ ปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

1.4 ขวดดองขนาด 8 ออนซ์ กระบอกตวง สไลด์ แผ่นปิดสไลด์ กล่องใส่สไลด์ บิ๊กเกอร์ พาราฟิน สีย้อม อีโอซิน (Eosin) และสีฮีมาท็อกไซลิน (Mayer's Hematoxylin)

1.5 ปิเปตสำหรับนับเม็ดโลหิตแบบโทม่า (Thoma type), ฮีมาโตไซโตมิเตอร์ และแผ่นปิดสไลด์

1.6 สารเคมี ไดออกแซน ไซลีน โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนเบสิค โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดเบสิค ขวดแก้วกลม, เมทานอล, น้ำกลั่น, แอลกอฮอล์ 100% เข็มฉีดยาปลายทู่ (Stomach
tube) เครื่องมือผ่าตัด อุปกรณ์ที่และสารเคมีจำเป็นอื่น ๆ

1.7 กล้องจุลทรรศน์, เครื่องตัดเนื้อเยื่อ(Microtome)

2. วิธีการแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

2.1 ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute Oral Toxicity) กับ หนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์, *Rattus norvegicus* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 2 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1. สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2. น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์

หนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ ทั้งเพศผู้และเพศเมีย อายุ 1 เดือน จำนวน 60 ตัว (เพศผู้ 30 ตัว และเพศเมีย 30 ตัว) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้องในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กรงละ 1 ตัว ให้อาหารและน้ำทุกวัน เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นชั่งน้ำหนักหนูทั้ง 2 เพศ เมื่อเริ่มทำการทดลอง โดยใช้ สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Ha*NPV) อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะโดยใช้เข็มฉีดยาปลายทู่ (Stomach tube) กับหนูนอรเว ตัวละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 กลุ่มๆละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) และให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับ หนูนอรเว 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัวและเพศเมีย 10 ตัว) เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ หลังการทดลอง 60 วัน สุ่มหนูขาวนอรเวเพศผู้มา กลุ่มละ 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว) เพื่อตรวจวัดคุณภาพของเชื้ออสุจิ เช่น วัดความเป็นกรด-ด่าง, จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ , นับจำนวนอสุจิที่มีชีวิต นับจำนวนอสุจิในส่วนหางของท่อพักอสุจิ (Cauda epididymis) ตัดอวัยวะภายในต่าง ๆ เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต ม้าม อวัยวะสืบพันธุ์ เป็นต้น มาศึกษาทางด้านมิญชวิทยา โดยวิธีการทางไมโครเทคนิค เพื่อการตรวจหาความผิดปกติของเนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ

บันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักหนูนอรเวก่อนและหลังให้เชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์
2. บันทึกความผิดปกติ พฤติกรรม การเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่หนูกิน ตลอดระยะเวลาการทดลอง
3. บันทึกความผิดปกติของเนื้อเยื่อต่างๆหลังให้เชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และกลุ่มเปรียบเทียบ

คุณภาพของอวัยวะสืบพันธุ์และอสุจิ

หลังจากทดลอง 60 วัน นำหนูนอรเวยมาทำให้สลบด้วยไดเอทธิลอีเทอร์ ใช้เข็มเจาะส่วนปลายของท่อพักอสุจิ (cauda epididymis) ดูดน้ำอสุจิออกมาตรวจวัดความเป็นกรด -ด่าง นับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ จำนวนอสุจิมีชีวิต จำนวนอสุจิในอัณฑะและในท่อพักอสุจิส่วนหาง

1. วัดความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เข็มเจาะส่วนหางของท่อพักอสุจิ ไหลออกมาและวัดความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกระดาษลิทมัส นำมาเปรียบเทียบกับสีมาตรฐานบนกล่อง

2. นับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ (Sperm motility) เก็บน้ำอสุจิจากส่วนหางของท่อพักอสุจิปริมาตร 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางด้วยสารละลาย Normal hank (pH 7.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บ่มอยู่ในน้ำอุ่น 30 องศาเซลเซียส 2-4 นาที เขย่าให้เข้ากันแล้วดูดมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนฮีมาโตไซโตมิเตอร์ เพื่อนำไปตรวจนับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สุ่มนับจำนวน 5 ช่องของฮีมาโตไซโตมิเตอร์ แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่

$$\text{เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่} = \frac{\text{จำนวนอสุจิเคลื่อนที่ x 100}}{\text{จำนวนอสุจิทั้งหมดที่นับได้}}$$

$$\text{จำนวนอสุจิทั้งหมด} = \text{จำนวนอสุจิเคลื่อนที่} + \text{จำนวนอสุจิไม่เคลื่อนที่}$$

3. นับจำนวนอสุจิที่มีชีวิต (Sperm viability) หยดสีอีโอซิน-นิโกรซิน (eosin-nigrosin) ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด นำน้ำอสุจิจากส่วนหางของท่อพัก ผสมกับสีบนสไลด์ ทิ้งไว้ 1 นาที นำแผ่นสไลด์อีกแผ่นมาสเมียร์ ลากผ่านหยดสีจนสุดแผ่นสไลด์ นำไปลนไฟจนแห้ง ตรวจนับจำนวนอสุจิเป็นและตายจำนวน 100 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยอสุจิที่เป็นจะไม่ติดสี ที่ตายแล้วจะติดสีแดงม่วง

$$\text{เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนอสุจิที่เป็น x 100}}{\text{จำนวนอสุจิที่นับทั้งหมด}}$$

4. นับจำนวนอสุจิในอัณฑะ ตัดอัณฑะมาชั่งน้ำหนัก นำไปบดด้วยที่บดเนื้อเยื่อ (grinder glass) ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนจนละเอียดใช้ไมโครปิเปต ดูดของเหลวที่ถูกบดปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบนฮีมาโตไซโตมิเตอร์ สุ่มนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่องของฮีมาโตไซโตมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

5. นับจำนวนอสุจิในส่วนหางของท่อพัก ตัดท่อพักส่วนหางมาชั่งน้ำหนักนำไปบดด้วยที่บด

เนื้อเยื่อในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บดจนละเอียด ใช้ไมโครปิเปตดูดของเหลว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดบนฮีมาโตไซโตมิเตอร์ สุ่มนับจำนวนอสุจิใน 5 ช่อง ของฮีมาโตรไซโตมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

$$\text{จำนวนอสุจิ} = 50 \text{ Nxdilution}$$

2.2 ขั้นตอนที่ 2. ศึกษาปริมาณเม็ดโลหิตของหนูนอรเว สายพันธุ์วิสตาร์ ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 กรรมวิธีๆ ละ 6 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สารแขวนลอยของผลึกไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 อนุภาคไวรัสเอ็นพีวีที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์

สุ่มให้เชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทั้งชนิดสารแขวนลอยของผลึกและอนุภาคไวรัส ที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม อัตรา $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร กับหนูนอรเว สายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน จำนวนกลุ่มละ 6 ตัว (เพศผู้ 3 ตัว เพศเมีย 3 ตัว) ทางปากลงสู่กระเพาะกับหนูตัวละ 200 ไมโครลิตร และให้น้ำเกลือโดยวิธีการเดียวกัน กับหนูจำนวน 6 ตัว เพื่อให้เป็นตัวเปรียบเทียบ นับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว จากโลหิตที่เจาะจากหางหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์ นำมาคำนวณปริมาณเม็ดโลหิตแดงและเม็ดโลหิตขาวต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิลิตร

การบันทึกข้อมูล 1. บันทึกน้ำหนักหนูก่อนและหลังทดลอง

2. บันทึกจำนวนเม็ดโลหิตแดงและโลหิตขาวของหนูทุกสัปดาห์เป็นเวลา 8 สัปดาห์

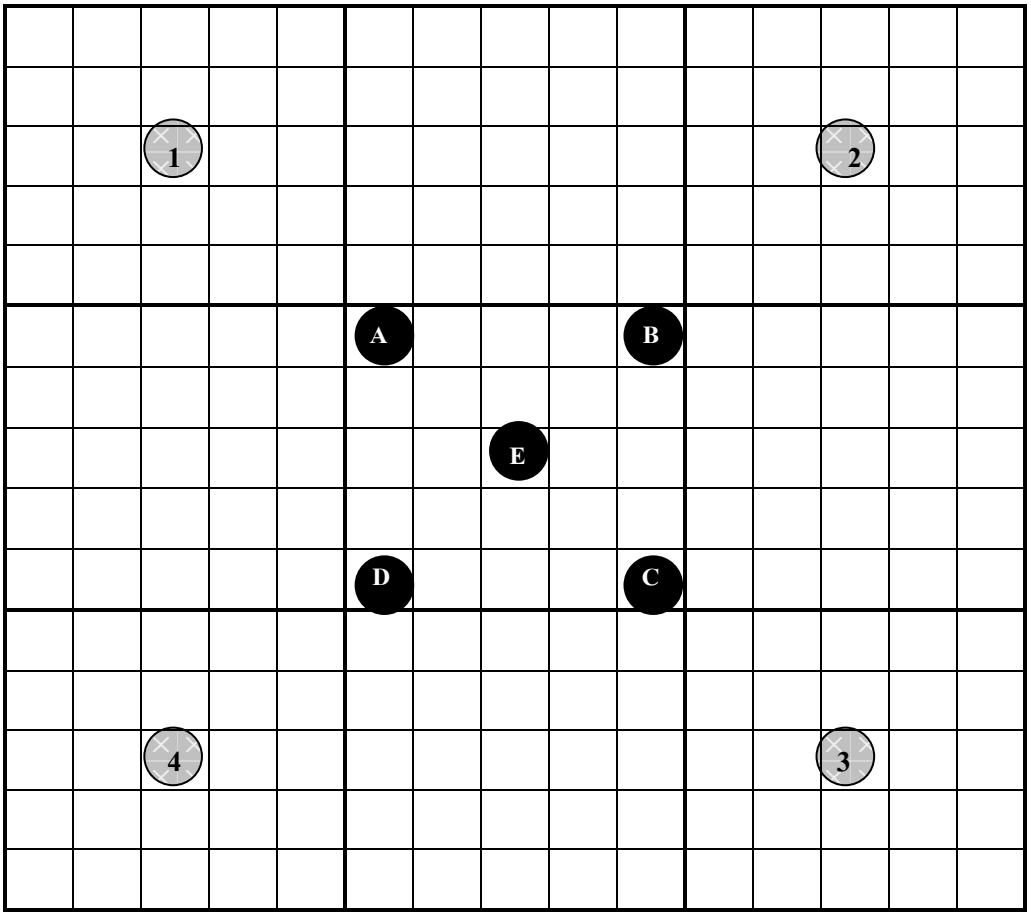
การนับจำนวนเม็ดโลหิตแดง

น้ำยา Grower's solution

Sodium sulfate	12.5	กรัม
Glacial acetic acid	33.3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

1. เจาะโลหิตจากหางของหนูนอรเว ด้วยเข็มเจาะเลือด (blood lancet) ดูดโลหิตเข้าโทม่าปิเปต (Thoma diluting pipette) ให้ถึงขีด 0.5 แล้วดูดน้ำยา Grower ขึ้นมาถึงขีด 101 เขย่าปิเปตประมาณ 2-4 นาที

2. หยดน้ำยา 2-3 หยด แรกทิ้งไป เพื่อขจัดน้ำยาส่วนที่อยู่ภายในที่ไม่มีโลหิตแดงออก
3. หยดสารละลายของเม็ดเลือดแดงปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนฮีมาโตไซโตมิเตอร์ นับจำนวนเม็ดโลหิตแดงใน 5 ช่อง จาก 25 ช่องเล็ก ของสี่เหลี่ยมใหญ่ที่อยู่ตรงกลาง (A,B,C,D,E) เมื่อนับครบ 5 ช่องแล้ว นำจำนวนเม็ดโลหิตแดง 5 ช่องรวมกัน นำมาคำนวณ หาจำนวนเม็ดโลหิตแดง ต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 จำนวนช่องที่นับเม็ดเลือดบนฮีมาโตไซโตมิเตอร์

การคำนวณ 1 ช่อง มีพื้นที่ 1/5 ตารางมิลลิเมตร และความลึก 0.1 มิลลิเมตร และโลหิตที่นับได้เจือ จาง 200 เท่า

$\therefore$ จำนวนเม็ดโลหิตแดงใน 1 มิลลิลิตร = (50x)(200) = 10, 000 x เม็ดโลหิต 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

X = จำนวนเม็ดโลหิตที่นับได้ 5 ช่อง (A,B,C,D,E) รวมกัน

การนับจำนวนเม็ดโลหิตขาว

1. เจาะโลหิตจากหางหนูนอรเว ด้วยเข็มเจาะเลือด (Blood lancet)
2. ดูดโลหิตเข้าโทม่าปิเปต (Thoma diluting pipette) ที่สำหรับนับเม็ดโลหิตขาว โดยดูดให้โลหิตเข้าไปถึงขีด 0.5
3. เจือจางโลหิตด้วยกรดอาซิติค (Acetic acid) 2-3 เปอร์เซ็นต์ โดยเจือจางให้ถึง ขีด 11
4. เขย่าปิเปตนาน 2-3 นาที หยด 2-3 หยดแรกทิ้ง เพื่อขจัดน้ำยาส่วนที่ไม่มีโลหิตขาวผสมอยู่ออกจากหลอดแคบปิลาริ่ (Capillary tube)ให้ออก
5. บรรจุน้ำเจือจางโลหิตลงบนฮีมาโตไซโตมิเตอร์ ทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้เม็ดโลหิตขาวกระจายตัวสม่ำเสมอและนอนก้นเรียบร้อย
6. นับเม็ดโลหิตขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ช่อง 1,2,3,4 (ภาพที่ 1) เมื่อนับครบ 4 ช่องแล้วนำจำนวนเม็ดโลหิตขาว 4 ช่อง มารวมกัน คำนวณหาจำนวนเม็ดโลหิตขาวต่อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

การคำนวณ

1 ช่อง (1,2,3 หรือ 4) มีพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร โลหิตเจือจาง 20 เท่า

$\therefore$ จำนวนเม็ดโลหิตขาว ในโลหิต 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร = 50x เม็ด

X = จำนวนเม็ดโลหิตขาวที่นับได้ 4 ช่อง (1,2,3,4) รวมกัน

ศึกษาทางมิญชวิทยา

ตัดชิ้นเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ เช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต อวัยวะสืบพันธุ์ ของหนู นอรเว หลังการให้เชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย แช่ในน้ำยาคงสภาพ (ฟอร์มาลิน 10%) ทิ้งไว้ 1 คืน ล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วยน้ำประปาที่ไหลตลอดเวลา 10-30 นาที ดูดเอาน้ำออก ด้วยเอธานอล 70%, 80%, 95% และ 100%, ไซลีน 2 ครั้ง พาราฟิน 2 ครั้ง ทำพาราฟินบล็อคแล้วตัดด้วยเครื่องไมโครโตม นำมาติดบนแผ่นสไลด์ แล้วนำมาย้อมสี ด้วยสีแฮรีส(Harris's Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) จากนั้นนำไปตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.3 ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาอาการเกิดโรค (Pathogenicity) และความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute Dermal Toxicity) กับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ *Rattus norvegicus* โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 5 กรรมวิธีๆ ละ 20 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ให้ทางปาก อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 น้ำเกลือ 1 % ให้ทางปาก

กรรมวิธีที่ 3 สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ให้ทางผิวหนัง อัตรา $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 อนุภาคไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่หลุดออกจากโปรตีนที่ห่อหุ้ม ให้ทาง ผิวหนัง อัตรา $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 น้ำเกลือ 1 % ให้ทางผิวหนัง

ศึกษาการเกิดอาการโรค กับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม จำนวน 40 ตัว (เพศผู้ 20 ตัว และ เพศเมีย 20 ตัว)โดย

กลุ่มที่ 1ให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะ โดยใช้เข็มฉีดยาปลายทู่กับหนูนอรเว ตัวละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัวและเพศเมีย 10 ตัว)

กลุ่มที่ 2 ให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับหนู นอรเว จำนวน 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว และเพศเมีย 10 ตัว) เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute Dermal Toxicity) กับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน จำนวน 60 ตัว (เพศผู้ 30 ตัว และเพศเมีย 30 ตัว) โดยโกนขนบริเวณด้านบนของส่วนหลัง 2 ด้าน ๆ ละ 2 ตารางเซ็นติเมตร ให้เชื้อไวรัสเอ็นพีวี กับหนูกลุ่มละ 20 ตัว

กลุ่มที่ 3 หยดสารแขวนลอยของผลึกไวรัส (polyhedrosis) เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร บริเวณด้านหลังของหนูด้านละ 100 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 4 หยดอนุภาคของไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ที่หลุดจากโปรตีนที่ห่อหุ้มแล้ว (free virus rods) บริเวณด้านหลังของหนูด้านละ 100 ไมโครลิตร

กลุ่มที่ 5 หยดน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ บนด้านหลังของหนูด้านละ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

บันทึกผลการทดลอง

1. บันทึกน้ำหนักหนูก่อนและหลังการทดลอง เป็นเวลา 14 วัน
2. บันทึกอาการ ความผิดปกติ การเจริญเติบโต ปริมาณอาหารที่หนูกิน ตลอดการทดลองเป็นเวลา 14 วัน
3. ศึกษาทางมิญชวิทยาโดยวิธีการทางไมโครเทคนิคกับหนู นอรเว หลังการทดลอง 14 วัน โดยดูความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ

เวลาและสถานที่

เริ่มทำการทดลอง ตุลาคม 2544 สิ้นสุด กันยายน 2546

สถานที่ทดลอง กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute Oral Toxicity) ของไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย กับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน โดยให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา ความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิเมตร ทางปากลงสู่กระเพาะกับหนูตัวละ 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 2 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว และให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบจำนวน 20 ตัว โดยวิธีการเดียวกัน

1. **น้ำหนักหนู** ใน 8 สัปดาห์ ของหนูกลุ่มให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 2 กลุ่ม และกลุ่มเปรียบเทียบมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (194.84 กรัม, 207.45 กรัม และ 195.81 กรัม) (ตารางที่ 1)
2. **ปริมาณการกินอาหาร** ใน 8 สัปดาห์ของหนูกลุ่มให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 2 กลุ่ม และกลุ่มเปรียบเทียบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (124.15 กรัม, 128.58 กรัม และ 138.94 กรัม) (ตารางที่ 1)
3. **ไม่มีหนูตาย**ในกลุ่มที่ให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 2 กลุ่มและ กลุ่มเปรียบเทียบใน 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 2)
4. **ผลต่อคุณภาพอสุจิ (Sperm quality)**
    - 4.1 **จำนวนอสุจิในอัณฑะ** ในหนูกลุ่มให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 2 กลุ่ม และ กลุ่มเปรียบเทียบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (38.1,27.21 และ 35.21 ล้านตัวต่อกรัมเนื้อเยื่ออัณฑะ) (ตารางที่ 3)
    - 4.2 **จำนวนอสุจิในท่อพักส่วนหาง** (Cauda epididymis) ในหนูกลุ่มให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 2 กลุ่มและกลุ่มเปรียบเทียบ มีจำนวนอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (453.28,477.64และ 461.13 ล้านตัวต่อกรัมเนื้อเยื่อท่อพักส่วนหาง)(ตารางที่ 3)
    - 4.3 **จำนวนอสุจิเคลื่อนที่** (Sperm motility) กลุ่มหนูที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ในปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร มี

จำนวนอสุจิเคลื่อนที่ลดลง อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%(57.97 และ 55.19 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่มีความแตกต่างกัน ในกลุ่มที่ให้เชื้อไวรัสเหมือนกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบ (74.49 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4)

4.4 **จำนวนอสุจิที่มีชีวิต** (Sperm viability)กลุ่มหนูที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ในปริมาณตัวละ 0.2 มิลลิลิตร มีจำนวนอสุจิที่มีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับกลุ่มเปรียบเทียบ (89.4,88.4 และ 88.95 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4)

5. **ผลต่อคุณภาพอวัยวะสืบพันธุ์** (Quality of reproductive organ) ของหนูนอรเวเพศผู้

5.1 **น้ำหนักอัณฑะ** (Testis) ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 0.2 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 1 มีน้ำหนักไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % กับกลุ่มเปรียบเทียบ (4.47 กรัมและ4.54 กรัม) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับกลุ่มที่ 2 ที่ให้ไวรัสปริมาณเดียวกัน (3.5 กรัม) (ตารางที่ 5)

5.2 **น้ำหนักต่อมน้ำกาม** (seminal vesicle) ในกลุ่มหนูที่ให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย 0.2 มิลลิลิตรต่อตัว 2 กลุ่ม และกลุ่มเปรียบเทียบมีน้ำหนักไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (1.15 กรัม, 1.22 กรัม และ 1.26 กรัม) (ตารางที่ 5)

6. **ผลต่อน้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ ของหนูนอรเวเพศผู้**

6.1 **น้ำหนักไต** (kidney) และ**ม้าม** (spleen) ของหนูกลุ่ม ที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร 2 กลุ่ม และกลุ่มเปรียบเทียบมีน้ำหนักของไตและม้ามไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (น้ำหนักไต 1.88 กรัม, 1.88 กรัม และ 1.89 กรัม น้ำหนักม้าม 0.72 กรัม, 0.7 กรัมและ 0.82 กรัม ตามลำดับ) (ตารางที่ 5)

7. ผลต่อน้ำหนักอวัยวะต่าง ๆ ของหนูนอรเวเพศเมีย

7.1 **น้ำหนักมดลูกและรังไข่** (Uterus and ovary) ของหนูกลุ่มที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย และ กลุ่มเปรียบเทียบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (0.79 กรัม, 0.7 กรัม และ 0.96 กรัมตามลำดับ)(ตารางที่ 6)

7.2 **น้ำหนักไตและม้าม** ของหนูกลุ่ม ที่ได้รับสารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย และกลุ่มเปรียบเทียบ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (น้ำหนักไต 1.22กรัม, 1.26 กรัม และ 1.42 กรัม, น้ำหนักม้าม 0.65 กรัม, 0.63 กรัม และ 0.67 กรัมตามลำดับ) (ตารางที่ 6)

8. ผลการศึกษาปริมาณเม็ดโลหิต

8.1 **น้ำหนักหนูนอรเว**กลุ่มที่ให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย, อนุภาคของไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่หลุดจากโปรตีนที่ห่อหุ้มแล้ว (Free virus rod) อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ปริมาณ ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะและกลุ่มเปรียบเทียบที่ให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักก่อนการให้เชื้อไวรัสและหลังการให้เชื้อไวรัสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % และทุกกลุ่มมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นหลังการทดลอง 8 สัปดาห์ (ตารางที่ 7)

8.2 **จำนวนเม็ดโลหิตแดง**ต่อโลหิต 1 มิลลิลิตร ของหนูกลุ่มที่ให้เชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทั้งชนิดสารแขวนลอย(polyhedra) และ Free virus rod ของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทางปากกับหนูนอรเวและให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบ นับจำนวนเม็ดเลือดก่อน และหลังการทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลอง จำนวนเม็ดโลหิตแดงก่อน และหลังทดลอง 8 สัปดาห์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น95%(ตารางที่ 8)

8.3 **จำนวนเม็ดโลหิตขาว**ต่อโลหิต 1 มิลลิลิตร ของหนูนอรเวที่ได้รับเชื้อไวรัสทั้งชนิด สารแขวนลอยและอนุภาคของไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ที่หลุดจากโปรตีนที่ห่อหุ้มแล้ว ทางปากลงสู่กระเพาะ ปริมาณ ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร และ ให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์กับหนูขาวใหญ่กลุ่มเปรียบเทียบ ผลการทดลอง จำนวนเม็ดโลหิตขาวก่อนการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่หลังการทดลองสัปดาห์ที่ 1-3 เม็ดเลือดขาวรวมทั้งชนิดลิมโฟไซด์และนิวโทรฟิล มีแนวโน้มลดจำนวนลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเปรียบเทียบ หลังจากนั้นสัปดาห์ที่ 4-8 จำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มที่ให้เชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด มีจำนวนไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% กับกลุ่มเปรียบเทียบ (ตารางที่ 9, 10,11)

9. **ผลการศึกษามิญชวิทยา (Histology)**

ผลการศึกษาเซลล์ และเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ของหนู นอรเว ที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ ทั้งกลุ่ม 14 วัน และ 60 วัน รวมทั้งกลุ่มที่ให้เชื้อไวรัส เอ็นพีวีทางผิวหนังโดยขบวนการทางไมโครเทคนิคและย้อมสี ฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน ดูเซลล์อวัยวะต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ผลการศึกษา ดังนี้

9.1**ระบบทางเดินอาหาร**

9.1.1 **กระเพาะอาหาร** (stomach) พบว่าเซลล์และเนื้อเยื่อในชั้นมิวโคซ่า (mucosa) ที่อยู่ติดกับช่องทางเดินอาหารมีเซลล์เยื่อบุผิวเป็นรูปทรงกระบอก (columnar epithelium) นิวเคลียสกลมติดสีม่วง

ของฮีมาท็อกไซลิน ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูของอีโอซิน เซลล์และเนื้อเยื่อในชั้นถัดออกมาคือ สับมิวโคซ่า (submucosa) และชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ไฟเบอร์ที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันธ์และเซลล์กล้ามเนื้อที่มีนิวเคลียสติดสีม่วงและไซโตพลาสซึมติดสีชมพู ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1)

9.1.2 **ลำไส้เล็ก** (Small intestine) พบว่าเซลล์และเนื้อเยื่อชั้นที่ติดกับช่องทางเดินอาหาร (mucosa) มีเซลล์เยื่อบุผิวเป็นรูปทรงกระบอกนิวเคลียสติดสีม่วงของฮีมาท็อกไซลิน ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูของอีโอซิน เซลล์ในชั้นถัดออกมาคือ submucosa จะพบเซลล์ไฟเบอร์ที่ยืดหยุ่นได้ (Elastic fiber และ Collagen fiber) และชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis) พบเซลล์กล้ามเนื้อที่นิวเคลียสติดสีม่วงและไซโตพลาสซึมติดสีชมพู ของกลุ่มหนูที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปาก อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน , 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์ปกติ ไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2)

9.1.3 **ลำไส้ใหญ่** (Large intestine) พบว่าเซลล์และเนื้อเยื่อชั้นที่ติดกับช่องทางเดินอาหารมีเซลล์เยื่อบุผิวเป็นรูปทรงกระบอก นิวเคลียสติดสีม่วงของฮีมาท็อกไซลิน ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูของอีโอซิน เซลล์ในชั้นถัดออกมาคือชั้น submucosa จะพบเซลล์ไฟเบอร์ที่ยืดหยุ่น (Elastic fiber) และชั้นกล้ามเนื้อพบเซลล์กล้ามเนื้อมีนิวเคลียสติดสีม่วงและไซโตพลาสซึมติดสีชมพู ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3)

9.1.4 **ตับ** (Liver) พบว่าเซลล์ตับ (hepatocyte) มีนิวเคลียสกลมขนาดใหญ่ติดสีม่วงของฮีมา ท็อกไซลิน ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูของอีโอซิน ของกลุ่มหนูที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปาก อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4)

9.2 **ไต** (Kidney) พบว่าเซลล์และเนื้อเยื่อของหน่วยไต (Nephron)โดยพบเซลล์ผนัง หลอดเลือดฝอย (endothelium) ของกลุ่ม หลอด เลือดฝอยที่ขดกันไปมาเป็นกลุ่ม (glomerulus) ยื่นเข้าไปใน Bowman' s capsule นั้นมีเซลล์เยื่อบุเป็นแบบเหลี่ยมแบน (simple squamous) ท่อไตที่ต่อจาก Bowman capsule เป็นท่อขนาดเล็ก คือ proximal tubule พบเซลล์เยื่อบุผิวเป็นลักษณะเหลี่ยมลูกบาศ์ก (simple cuboid) มีนิวเคลียสกลมอยู่ที่ฐานของเซลล์ติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมติดสีแดงแต่ แตกต่างกับเซลล์อื่น ๆ ของหน่วยไต โดยที่ปลายขอบบนของเซลล์เป็นริ้วคล้ายแปรง (brush border) ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อ (lumen) และท่อไต ส่วน distal tubule มีเซลล์เยื่อบุผิวแบบเหลี่ยมลูกบาศ์ก (simple cuboid) ที่ต่ำกว่า

เซลล์เยื่อบุผิวของท่อส่วน proximal นิวเคลียสกลมติดสีม่วง ไซโตพลาสซึม ติดสีชมพูและท่อไตขนาดใหญ่ (collecting duct) พบเซลล์เยื่อบุผิวเป็นรูปทรงกระบอก (simple columnar) ของกลุ่มหนูที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนัง มีลักษณะเนื้อเยื่อและเซลล์ปกติไม่แตกต่างจากกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5)

9.3 **ปอด** (Lung) พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของถุงลมปอด (alviola) มีลักษณะเหลี่ยมแบน (squamous alviola epithelium) นิวเคลียสกลมใหญ่ติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมน้อยติดสีชมพู และเซลล์แบบเหลี่ยมลูกบาศ์ก (cuboidal alviola epithelium) ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนัง มีลักษณะเนื้อเยื่อและเซลล์ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6)

9.4 **หัวใจ และกล้ามเนื้อ** (Heart and muscle) พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อของทั้งหัวใจและกล้ามเนื้อมีลักษณะเป็นแท่งยาว นิวเคลียสกลมรีติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมติดสีชมพู ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนัง มีลักษณะเนื้อเยื่อและเซลล์ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 7)

9.5 **ม้าม** (Spleen) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาว (Lymphocyte) อยู่เป็นกลุ่ม ๆ ภายในอวัยวะเรียกว่า Sphenic nodule (white pulp) และเซลล์เม็ดเลือดแดงกระจายอยู่ระหว่างกลุ่มเม็ดเลือดขาวเรียกว่า red pulp ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนังมีลักษณะเนื้อเยื่อและเซลล์ปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 8)

9.6 เนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) พบว่าเซลล์ไขมัน (adipose cell) มีลักษณะกลมโดยมีไซโตพลาสซึม ขนาดใหญ่ไม่ติดสีของอีโอซิน นิวเคลียสมีขนาดเล็กถูกเบียดชิดติดกับผนังเซลล์ (cell membrane) ติดสีม่วงของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนัง มีลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อไขมันปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 9)

9.7 ระบบสืบพันธุ์ (Reproductive system)

9.7.1 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Male reproductive organ)

9.7.1.1 อัณฑะ (Testis) พบว่าท่อผลิตอสุจิ (seminiferous tubule) มีเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ 4-6 ชั้นเรียง ตามลำดับตั้งแต่ชั้นล่างสุดติดกับส่วน basement membrane ไปถึงชั้นบนสุดที่ติดกับช่องว่างของท่อผลิตอสุจิ (lumen) คือเซลล์สืบพันธุ์ตั้งต้น (spermatogonium) เซลล์สืบพันธุ์ลำดับที่ 1

(primary spematocyte) เซลล์สืบพันธุ์ลำดับที่ 2 (secondary spermatocyte) เซลล์สืบพันธุ์ที่เริ่มพัฒนา (spermatid) และเซลล์อสุจิ (spermatozoa) และพบเซลล์ผลิตฮอร์โมนเพศ (Leydig cell) มีรูปหลายเหลี่ยม นิวเคลียสกลมใหญ่ติดสีม่วงอยู่กลางเซลล์ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพู ของกลุ่มที่ได้รับเชื้อ ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10)

9.7.1.2 ท่อพักอสุจิส่วนหาง (Cauda epididymis) พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของท่อพักอสุจิมีรูปร่างเป็นเหลี่ยมลูกบาศ์ก นิวเคลียสกลมติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมติดสีชมพู ภายในท่อพักอสุจิพบตัวอสุจิมากมาย ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์เนื้อเยื่อปกติไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11)

9.7.2. อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (Female reproductive organ)

9.7.2.1 รังไข่ (Ovary) พบเซลล์ และเนื้อเยื่อชั้นนอกของรังไข่ (Cortex) ถูกปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อเจริญ (germinal epithelium) เซลล์มีรูปร่างเหลี่ยมแบนและเหลี่ยมลูกบาศ์ก(simple squamous และ cuboidal epithelium) เป็นชั้นที่มีการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไข่ (ovule) ชั้นถัดเข้าไปเป็นเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันธ์ที่หนาแน่น (dense irregular connective tissue) ของหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทั้งกลุ่ม 14 วัน, 60 วัน และกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางผิวหนังมีลักษณะเซลล์และเนื้อเยื่อปกติ ไม่แตกต่างกับกลุ่มเปรียบเทียบที่ได้รับน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 12)

การศึกษาอาการเกิดโรค (Pathogenicity) กับหนูนอรเวสายพันธ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน โดยให้สารแขวนลอยเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ปริมาณตัวละ 0.2 มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะโดยใช้เข็มฉีดยาปลายทู่ และให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบกลุ่มละ 20 ตัว ผลการทดลองภายในระยะเวลา 14 วัน น้ำหนักหนูกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย และกลุ่มเปรียบเทียบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (149.4 กรัม และ 149.72 กรัม ตามลำดับ) ปริมาณการกินอาหารที่หนูกลุ่มได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวี และกลุ่มเปรียบเทียบไม่แตกต่างกันทางสถิติระดับความเชื่อมั่น 95% (115.59 กรัม และ 121.14 กรัม) (ตารางที่ 12) ไม่มีหนูตายในกลุ่มที่ให้เชื้อไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย และกลุ่มเปรียบเทียบ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute Dermal Toxicity) ของไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย กับหนูนอรเวสายพันธุ์ วิสตาร์ อายุ 1 เดือน กลุ่มละ 20 ตัว โดยหยดสารแขวนลอย (polyhedra)เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตราเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร อนุภาคไวรัส

เอ็นพีวีที่หลุดออกจากโปรตีนที่ห่อหุ้ม (free virus rods) ด้านบนของส่วนหลังที่โกนขนแล้ว 2 ด้านๆ ละ 0.1 มิลลิลิตร และหยดน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับ หนูกลุ่มเปรียบเทียบ ผลการทดสอบ ไม่มีความผิดปกติของผิวหนัง และพฤติกรรมหนูทั้ง 3 กลุ่ม น้ำหนักหนูและปริมาณ การกินอาหารที่หนูในกลุ่มที่ได้รับเชื้อไวรัสและกลุ่มเปรียบเทียบไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น95% (น้ำหนักหนู 136.96 กรัม, 144.67 กรัมและ 133.26 กรัม, ปริมาณอาหาร 118.27 กรัม, 108.71 กรัม และ 108.71 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

Harrap (1982) ศึกษาความเป็นพิษและการเกิดโรคของเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายและหนอนกระทู้ชนิดต่างๆ กับหนู กระต่าย ในอัตรา 6×10^{9} ถึง 3×10^{12} ผลึก/กิโลกรัม ทั้งทางปากและทางผิวหนัง พบว่าไม่เกิดความเป็นพิษ ไม่มีความแตกต่างกันของน้ำหนัก พฤติกรรม อาการน้ำหนักอวัยวะ และไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายกับหนูนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ครั้งนี้ นอกจากนั้นยังพบว่าไม่เกิดการเป็นมะเร็งและความผิดปกติของลูกในท้องหนูทดลองยังไม่พบการระคายเคืองทางตาและผิวหนังผลกระทบของไวรัสเอ็นพีวีมีผลมาจากอนุภาคไวรัส ความเฉพาะเจาะจงของสัตว์อาศัย (host) จึงเป็นสิ่งสำคัญโดยตรงในความเข้าใจการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค ดังนั้นความกังวลของมนุษย์ในการนำเอ็นพีวีมาใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชว่าอาจไม่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสัตว์ที่อาศัยในบริเวณนั้น เช่น การใช้เอ็นพีวีของหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด กับหนูกินีพิค (Guinea pig) ทั้งสูดดมและฉีดเข้าช่องท้องใน 19 วัน หรือให้กินทางปาก ก็ยังพบว่า ไม่พบการระคายเคืองทางผิวหนัง ทางตา ไม่เกิดความเป็นพิษหรือพฤติกรรมเปลี่ยนแปลง(Meinecke , McLane และ Rennborg,1970) หนูแฮมสเตอร์จีน (Chinese hamster) และ หนูหริ่ง (NMRI mice) ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของ *Mamesta brassicae* (L.), *Autographa californica* (Sprayer) และอนุภาคไวรัสของ *Laspeyresia pomonella* (L.) ทางปาก และฉีดเข้าช่องท้อง ปริมาณ 3×10^{10} อนุภาค ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ดูผลใน 36 ชั่วโมง พบว่าหนูไม่แสดงอาการเจ็บป่วย มีพฤติกรรมปกติ น้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Reimann and Miltenburger,1982) ซึ่ง Granados และ Federia (1982) กล่าวถึงการใช้ baculovirus ของหนอนผีเสื้อและด้วง ไม่มีผลกับมนุษย์ การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของทารกในครรภ์ ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กำจัดแมลงที่ได้มีการศึกษาความปลอดภัยต่อสัตว์และสิ่งแวดล้อมแล้ว จึงมีการนำมาขายในรูปสูตรต่างๆ ในต่างประเทศ เช่นไวรัสเอ็นพีวีของหนอนผีเสื้อ (codling moth) และหนอนม้วนใบในยุโรป อเมริกากลาง ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนคืบ (celery looper) ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนคืบอัลฟัลฟ่า (alfalfa looper NPV) (Ignoffo,1973) ดังนั้นการนำเชื้อไวรัสเอ็นพีวีไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชในสภาพแวดล้อมที่มีสัตว์เลือดอุ่น และสัตว์อื่นๆทีกินพืชนั้นเป็นอาหาร ย่อมไม่มีผลกระทบต่อสัตว์เหล่านั้น ซึ่งในประเทศไทยได้นำไวรัสเอ็นพีวีจากสหรัฐอเมริกามาจำหน่ายเป็น

การค้า 2 ชนิด คือ ไวรัสเอ็นพีวีของหนอนกระทู้ผัก ชื่อ Gemstar และไวรัสเอ็นพีวีของหนอนกระทู้หอม เพื่อกำจัดหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอมในพืชผักต่างๆ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย กับหนูขาวนอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน โดยให้เชื้อไวรัสเอ็นพีวี อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ทางปากลงสู่กระเพาะกับหนูตัวละ 0.2 มิลลิลิตร แล้วดูผลภายใน 60 วัน และให้น้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบโดยวิธีการเดียวกัน ผลการทดสอบ ไม่มีหนูตายในกลุ่มทดสอบ ในกลุ่มเปรียบเทียบ รวมทั้งไม่มีความผิดปกติด้านพฤติกรรม น้ำหนัก ปริมาณอาหารที่กิน เนื้อเยื่อ และเซลล์ของอวัยวะต่างๆ จำนวนอสุจิในอัณฑะและท่อพักอสุจิ จำนวนอสุจิที่มีชีวิตคุณภาพอวัยวะสืบพันธุ์ จำนวนเม็ดโลหิตแดงและขาวไม่แตกต่างกัน ในกลุ่มทดสอบและกลุ่มเปรียบเทียบ

การศึกษาการเกิดโรคกับหนู นอรเวสายพันธุ์วิสตาร์ อายุ 1 เดือน โดยให้ไวรัส เอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทางปากอัตรา ความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร และน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับกลุ่มเปรียบเทียบ และดูผลภายใน 14 วัน ผลการทดสอบ ไม่มีความแตกต่างกันในด้านน้ำหนัก ปริมาณอาหารที่กิน ไม่มีความผิดปกติของเนื้อเยื่อและเซลล์ของอวัยวะต่างๆ และไม่มีหนูตายในกลุ่มทดสอบที่ให้เชื้อไวรัส และกลุ่มเปรียบเทียบ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังของไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย ทั้งชนิดสารแขวนลอย (Polyhedra) อัตราความเข้มข้น $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร และอนุภาค ไวรัสที่หลุดจากโปรตีนที่ห่อหุ้ม (free virus rods) โดยหยดบนส่วนหลังที่โกนขน ของหนูตัวละ 0.1 มิลลิลิตร และหยดน้ำเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ กับหนูกลุ่มเปรียบเทียบ ผลการทดสอบไม่มีความผิดปกติที่ผิวหนังและพฤติกรรมของหนูทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกัน น้ำหนักหนู ปริมาณอาหารที่หนูกินทั้งกลุ่มให้เชื้อไวรัส และกลุ่มเปรียบเทียบ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณอุทัย เกตุนุติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย เพื่อใช้ในการทดลอง และ ให้คำปรึกษาแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทดลองครั้งนี้ รวมทั้งนักวิชาการ พนักงาน ลูกจ้างของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่ให้ความร่วมมือในการทำงานวิจัย และประสบความสำเร็จตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2542. นโยบายอารักขาพืชของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

วิทย์ นามเรืองศรี และบุษบง มนัสมั่นคง. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูอ่อนโดยวิธีผสมผสาน. เอกสารวิชาการ การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.หน้า 122-134.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อุทัย เกตุนุติ และเกศรา จีระจรรยา. 2543. ผลการใช้สารเพิ่มฤทธิ์กับเชื้อไวรัสและสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย. ว.กีฏ.สัตว. 22(1):36-43

อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และพิมลพร นันทะ. 2537. ปรับปรุงการผลิตและทำสูตรสำเร็จของไวรัส NPV. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2537. กลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 457-486.

อุทัย เกตุนุติ. 2540. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัสเอ็นพีวี. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 72 หน้า.

อุทัย เกตุนุติ. 2542. บทบาทของไวรัสในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารประกอบการประชุมสัมนาทางวิชาการ สารชีวินทรีย์ กำจัดศัตรูพืชในศตวรรษที่ 21. 15-16 กรกฎาคม 2542. โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น หลักสี่ กรุงเทพฯ. หน้า 83-103.

อุทัย เกตุนุติ. 2543. ประเมินผลการส่งเสริมและพัฒนานำเชื้อไวรัสไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในประเทศ
กำลังพัฒนา (ประเทศอินเดียและประเทศไทย). ว.กีฏ. สัตว. 22(1): 53-55.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การใช้ไวรัส Nuclear Polyhedrosis Virus ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารอัดสำเนา. 13หน้า

Burges, H.D. 1981. Safety and safety testing and quality control of microbial pesticide *In* Microbial Control of Pest and Plant Disease 1970-1980. Academic Press,London.

Granados, R,R. and B.A. Federia (eds.). 1986. The Biology of Baculovirus , Vol. I. CRC Press,Inc. p. 177-202.

Harrap, K.A. 1982. Assessment of the human and ecological hazard of microbial insecticide. Parasitology. 84-269.

Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates. Annals of the New York Academy of Science. 217: 141-164.

Meinecke, C.F., W.C. McLane and C.S. Rennborg. 1970. Inhalation and dermal allergenicity studies of a nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* in guinea pigs. Journal of Invertebrate Pathology. 15: 207-210.

Reimann, R.R. and H.G. Miltenburger. 1982. Cytogenetic studies in mammalian cells after treatment with insect pathogenic viruses(Baculoviridae) : in vivo studies with rodents. Entomophaga. 27(3): 267-276.

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ยของหนูและปริมาณเหยื่อที่หนูกิน หลังจาก 8 สัปดาห์ ที่หนูได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร และน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	เพศ, จำนวนหนู	น้ำหนักหนูเฉลี่ย (กรัม)	ปริมาณอาหารที่หนูกินเฉลี่ย (กรัม)
กลุ่มที่ 1	ผู้ 10	194.84 $\pm$ 62.72	124.15 $\pm$ 25.75
(ให้ทางปาก)	เมีย 10	(103.98-271.27)	(96.23 -161.19)
กลุ่มที่ 2	ผู้ 10	207.45 $\pm$ 58.13	128.58 $\pm$ 16.62
(ให้ทางปาก)	เมีย 10	(107.15-274.68)	(128.58 -155.72)
เปรียบเทียบ	ผู้ 10	195.81 $\pm$ 67.78	138.94 $\pm$ 41.21
(น้ำเกลือ 1 %)	เมีย 10	(79.50-278.51)	(90.86 -224.08)
CV (%)		31.6	22.7

ตารางที่ 2 จำนวนหนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา $2x10^9$ ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

กลุ่มทดลอง	เพศ,จำนวนหนู	ระยะเวลาหลังจากให้เชื้อไวรัส (สัปดาห์)								
		สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 0 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
กลุ่มที่ 1	ผู้ 10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
(ให้ทางปาก)	เมีย 10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ผู้และเมีย	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
กลุ่มที่ 2	ผู้ 10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
(ให้ทางปาก)	เมีย 10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ผู้และเมีย	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
เปรียบเทียบ	ผู้ 10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
(น้ำเกลือ 1%)	เมีย 10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	ผู้และเมีย	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์อสุจิ ในอัณฑะ, ส่วนหางของท่อพักเชื้อ และ ความเป็นกรดด่างของน้ำเชื้อในส่วนหางของท่อพักเชื้อในหนูเพศผู้ หลังจาก 60 วัน ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวี ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอัตรา $2x10^9$ ผลึก1 / มิลลิลิตรและน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	% อสุจิในอัณฑะ (10^6/ กรัม เนื้อเยื่อ)	จำนวนอสุจิในส่วนหางของท่อพักเชื้อ (10^6/ กรัม เนื้อเยื่อ)	ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อ
กลุ่มที่1	38.10±22.97	453.28±319.84	7.0±0.16
(ให้ทางปาก)	(4.62-82.55)	(38.26-916.67)	(6.8-7.2)
กลุ่มที่ 2	27.21±5.93	477.64±191.88	6.97±0.07
(ให้ทางปาก)	(15.0-33.49)	(232.76-796.61)	(6.8-7.0)
เปรียบเทียบ	35.21±9.54	461.13±173.2	7.03±0.15
(น้ำเกลือ 1%)	(19.69-46.36)	(183.91-784.48)	(6.8-7.4)
CV (%)	**46.1**	49.1	2

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่ อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ของหนูนอรเว หลังจาก 60 วัน ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปาก อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร และน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	อสุจิที่เคลื่อนที่ 1/ (%)	อสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ 1/ (%)	อสุจิที่มีชีวิต (%)	อสุจิที่ไม่มีชีวิต (%)
กลุ่มที่1	57.97±4.36 b	42.03±4.36 a	89.40±8.72	10.60±8.72
(ให้ทางปาก)	(48.78-62.5)	(37.5-51.22)	(66.5-96.0)	(4.0-33.5)
กลุ่ม่ที่ 2	55.19±1.54 b	44.81±1.54 a	88.40±5.94	11.60±5.94
(ให้ทางปาก)	(53.33-57.14)	(42.86-46.67)	(81.5-96.5)	(3.5-23.0)
เปรียบเทียบ	74.49±7.25 a	25.51±7.25 b	88.95±5.29	11.05±5.31
(น้ำเกลือ 1%)	(64-86.11)	(13.89-29.41)	(80.0-97.0)	(3.0-17.5)
CV (%)	8.4	14.0	8.6	68.6

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยอวัยวะต่างๆของหนูนอรเวเพศผู้ หลังจาก 60 วัน ทีได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร และ น้ำเกลือ 1 % ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	อัณฑะ 1/ (กรัม)	ต่อมน้ำกาม (กรัม)	ไต (กรัม)	ม้าม (กรัม)
กลุ่มที่1	4.47±0.63 a	1.15±0.16	1.88±0.18	0.72±0.1
(ให้ทางปาก)	(3.4-5.5)	(0.9-1.5)	(1.5-2.0)	(0.6-0.8)
กลุ่มที่ 2	3.57±0.46 b	1.22±0.17	1.88±0.19	0.70±0.05
(ให้ทางปาก)	(2.5-4.1)	(1.0-1.5)	(1.7-2.1)	(0.6-0.8)
เปรียบเทียบ	4.54±0.69 a	1.26±0.27	1.89±0.16	0.82±0.18
(น้ำเกลือ 1%)	(2.8-5.2)	(0.9-1.7)	(1.7-2.1)	(0.6-1.2)
CV (%)	12	18.7	9.8	17

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ยอวัยวะต่างๆ ของหนูนอรเวเพศเมีย หลังจาก 60 วัน ที่ได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายอัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร และน้ำเกลือ 1 %ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	มดลูกและรังไข่ 1/ (กรัม)	ไต 1/ (กรัม)	ม้าม (กรัม)
กลุ่มที่1	0.79±0.17 ab	1.22±0.11 b	0.65±0.14
(ให้ทางปาก)	(0.6-1.0)	(1.1-1.4)	(0.5-1.0)
กลุ่มที่ 2	0.70±0.28 b	1.26±0.08 b	0.63±0.11
(ให้ทางปาก)	(0.4-1.3)	(1.1-1.4)	(0.5-0.8)
เปรียบเทียบ	0.96±0.31 a	1.42±0.10 a	0.67±0.05
(น้ำเกลือ 1%)	(0.5-1.4)	(1.3-1.6)	(0.6-0.7)
CV (%)	30.9	5.4	17.7

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 7 หนักเฉลี่ยของหนูนอรเว ที่เจาะตรวจเลือด ใน 8 สัปดาห์ หลังจากหนูได้รับสารแขวนลอยและอนุภาคเชื้อไวรัสเอ็นพีวีที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มของหนอนเจาะ สมอฝ้าย อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิคร และน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	น้ำหนักหนู (กรัม) ภายหลังจากให้เชื้อไวรัส (สัปดาห์)								
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6 1/	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
สารแขวนลอยไวรัสเอ็นพีวี (A)	100.6±4.58 (92.0-105.6)	122.1±10.94 (102.2-131)	165.5±28.39 (122.7-188.6)	186.0±34.88 (126.3-215.5)	222.7±36.93 (165.9-260.2)	244.9±42.86 (177-282)	262.9±48.28 a (186.6-305)	279.5±55.92 (188.7-333)	294.2±57.33 (200.9-343.6)
อนุภาคไวรัสไม่มีโปรตีน (B)	99.3±11.55 (84.7-112.8)	122±16.22 (101.5-139.4)	157.8±32.29 (121.2-199.2)	175.1±35.73 (131.4-215.6)	202.3±48.77 (151.4-259.5)	224±52.51 (166.2-283.3)	256.9±48.17 ab (192.7-306.5)	248.1±57.61 (188.4-320.2)	266±63.18 (194.8-339.6)
เปรียบเทียบ (C)	100.3±11.36 (86.3-118)	112.9±14.8 (92.8-130.3)	155.0±25.83 (120.7-182.6)	174.6±38.98 (120.7-214.7)	201.1+42.95 (151.1-255.5)	223.4±50.29 (169.5-283.5)	234.8±55.03 b (179-298.7)	255.7±67.57 (182.5-325.7)	267.4±56.48 (209.8-329.8)
CV (%)	6.4	5.8	9.5	9.5	9.1	9.1	7.8	11.2	9.7

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 8 เซลล์เม็ดเลือดแดงของหนูนอรเว ใน 8 สัปดาห์ หลังจากหนูได้รับสารแขวนลอยของเชื้อไวรัสและอนุภาคไวรัสที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มของหนอนเจาะสมอฝ้าย อัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มิลลิลิตร และน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	เซลล์เม็ดเลือดแดง ($1x10^4$ / มิลลิลิตร) หลังจากให้เชื้อไวรัส (สัปดาห์)								
	สัปดาห์ที่ 0 1/	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3 1/	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8 1/
สารแขวนลอยไวรัสเอ็นพีวี (A)	7703.3±1267.6 ab (6010-9590)	7114.2±951.31 (6080-8715)	8193.3±2219.49 (5920-10695)	9299.2±1726.33 a (6460-11660)	8186.7±2294.19 (5100-10325)	10010.8±542.56 (9280+10895)	9320±1454.36 (7325-10975)	7823.3+1038.23 (6705-9335)	8809±1354.54 b (6210-9595)
อนุภาคไวรัสไม่มีโปรตีน (B)	8476.7±1015.57 a (6675-9545)	7945.8±1234.44 (6360-9855)	7563.3±1812.56 (4430-9735)	7965.7±1649.17ab (5210-9579)	9248±763.26 (7800-10000)	8407.5±1972.07 (6390-10865)	8483.75±1387.9 (6795-8675)	8982.5±2430.39 (4625-11095)	9170±1213.13 ab (7895-10985)
เปรียบเทียบ (C)	7087.8±497.32 b (6725-7765)	7693.3±232.07 (7405-7970)	7273.3±1111.82 (5520-8650)	7333.3±847.97 b (5745-7940)	6919.2±2022.71 (4095-9335)	8070±2025.53 (5600-10470)	7969.17±1687.7 (6145-10540)	7805±1034.61 (6300-9150)	10432±1012.26 a (8790-11930)
CV (%)	11	11.6	22.9	16.9	25.7	18.4	17.7	17.4	11.1

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 9 เซลล์เม็ดเลือดขาวต่อมิลลิลิตรของหนูนอรเว ใน 8 สัปดาห์ หลังจากได้รับสารแขวนลอยของไวรัสและอนุภาคไวรัสเอ็นพีวีที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มของหนอนเจาะสมอฝ้ายอัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มล. และน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	เซลล์เม็ดเลือดขาว/มล. หลังจากให้เชื้อไวรัส (สัปดาห์)								
	สัปดาห์ที่ 0	สัปดาห์ที่ 1 1/	สัปดาห์ที่ 2 1/	สัปดาห์ที่ 3 1/	สัปดาห์ที่ 4 1/	สัปดาห์ที่ 5 1/	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
สารแขวนลอยไวรัสเอ็นพีวี (A)	10779.2±1922.07 (8725-13425)	9591.7±2366.84 b (6050-13125)	14979.2±6344.43ab (9100-25975)	16300±3269.21 a (12775-21550)	19379.2±8282.87 a (9650-21850)	23087.5±5565.22a (17475-32150)	10275±3859.05 (5925-17125)	9420.8±4469.88 (4900-14700)	9188.2±2413 (6500-12475)
อนุภาคไวรัสไม่มีโปรตีน (B)	9991±2750.89 (7950-11200)	16445.8±4972.01 a (10450-24925)	16150±9290 a (6100-31275)	15791.7±6130.47a (9225-26950)	16979.2±1579.04 ab (15400-19100)	13337.5±1715.21 b (11925-16725)	11037.5±2563.24 (7925-14150)	7325±3448.22 (4800-14075)	10395.8±4582.91 (4350-14925)
เปรียบเทียบ (C)	10191.7±5747.21 (4950-19750)	7204.2±1829.71 b (5800-9925)	5212.5±1801.37 b (3275-7450)	10170.8+3191.8 b (7625-13975)	10545.8±2475.5 b (6950-12425)	11262.5±2005.41 b (8275-13575)	7191.7±2675.66 (4425-12150)	11850±7107.50 (4350-24000)	12683.3±3766.49 (7825-16800)
CV (%)	35.2	29	63.7	27.4	32.7	23.4	33.1	59.9	33.5

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ของหนูนอรเว ใน 8 สัปดาห์ หลังจากหนูได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปาก ทั้งชนิดสารแขวนลอยและอนุภาคไวรัสที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม และกลุ่มเปรียบเทียบ ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	ลิมโฟไซต์ (%)								
	สัปดาห์ที่ 0 1/	สัปดาห์ที่ 1 1/ (หลังจาก 1 วัน)	สัปดาห์ที่ 2 1/	สัปดาห์ที่ 3 1/	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7 1/	สัปดาห์ที่ 8
ไวรัสเอ็นพีวี (A)	84.83±5.15 ab (77-91)	81.0±6.26 a (74-91)	75.33±5.57ab (66-82)	78.67±6.28 b (69-86)	82.17±7.03 (72-91)	79.67 ±7.28 (66-85)	84.67±6.71 (75-93)	74.83±3.87 b (69-79)	84.8±9.26 (68-96)
อนุภาคไวรัสไม่มีโปรตีน (B)	78.50±5.13 b (71-83)	69.33±7.17 b (55-74)	68.33±5.39 b (61-76)	78.17 ±14.05 b (62-94)	83.83 ±10.09 (64-92)	78.83 +15.2 (58-97)	85.5 ±6.16 (74-92)	80.33±10.86 ab (68-93)	88.83±5.04 (81-93)
เปรียบเทียบ (C)	86.17±4.31 a (80-93)	88.5±6.22 a (78-93)	82.5±8.73 a (66-90)	90 ±4.94 a (85-96)	82.5±7.97 (72-93)	88.17 ± 6.55 (79-96)	89.33 ± 6.44 (81-98)	84.50±5.17 a (76-91)	86.0 ±5.10 (78-91)
CV (%)	6.6 (ns)	8.1 (**)	10.8 (*)	10.2 (ns)	10.9 (ns)	14.1 (ns)	8.0 (ns)	9.0 (ns)	8.3 (ns)

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ของหนูนอรเว ใน 8 สัปดาห์ หลังจากหนูได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากทั้งชนิดสารแขวนลอยและอนุภาคไวรัสที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม และกลุ่มเปรียบเทียบ ในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

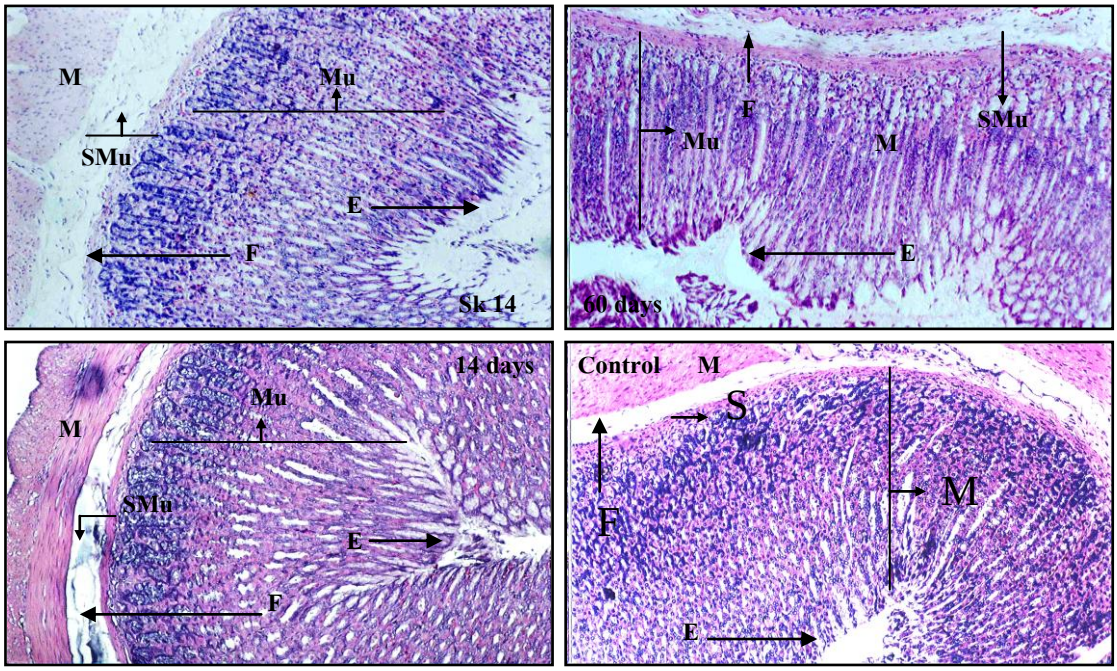
	% นิวโทรฟิล								
กลุ่มทดลอง	สัปดาห์ที่ 0 1/	สัปดาห์ที่ 1 1/ (หลังจาก 1 วัน)	สัปดาห์ที่ 2 1/	สัปดาห์ที่ 3 1/	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 7	สัปดาห์ที่ 8
ไวรัสเอ็นพีวี	13.17±5.08 ab	17.50±5. 75 b	24.67± 4.76 ab	20.67±6.95 a	15.67±6.83	16.83±6.52	12.67±6.05	23.17±3.31	13.83±9.26
(A)	(7-20)	(8-24)	(20-33)	(13-31)	(6-24)	(9-28)	(6-20)	(20-28)	(3-31)
อนุภาคไวรัสไม่มี	18.33± 4.97 a	27.0±7.51 a	30.17± 5.84 a	19.0±13.88 ab	13.67± 8.78	17.83±13.85	12.5±6.59	17.33±9.83	9.0±4.47
โปรตีน (B)	(13-25)	(21-42)	(22-39)	(4-38)	(6-31)	(6-34)	(7-25)	(6-30)	(5-16)
เปรียบเทียบ	10.50± 3.39 b	8.33±3.72 b	16.17± 9.66 b	9.17 ±4.49 b	16.33±7.12	11.0±6.69	8.83±5.74	14.33±5.75	13.0±5.06
(C)	(6-14)	(5-14)	(8-34)	(4-14)	(7-26)	(3-20)	(2-18)	(8-24)	(9-17)
CV (%)	38.9	34.3	35.6	51	54.7	67.2	59.7	37.6	58

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

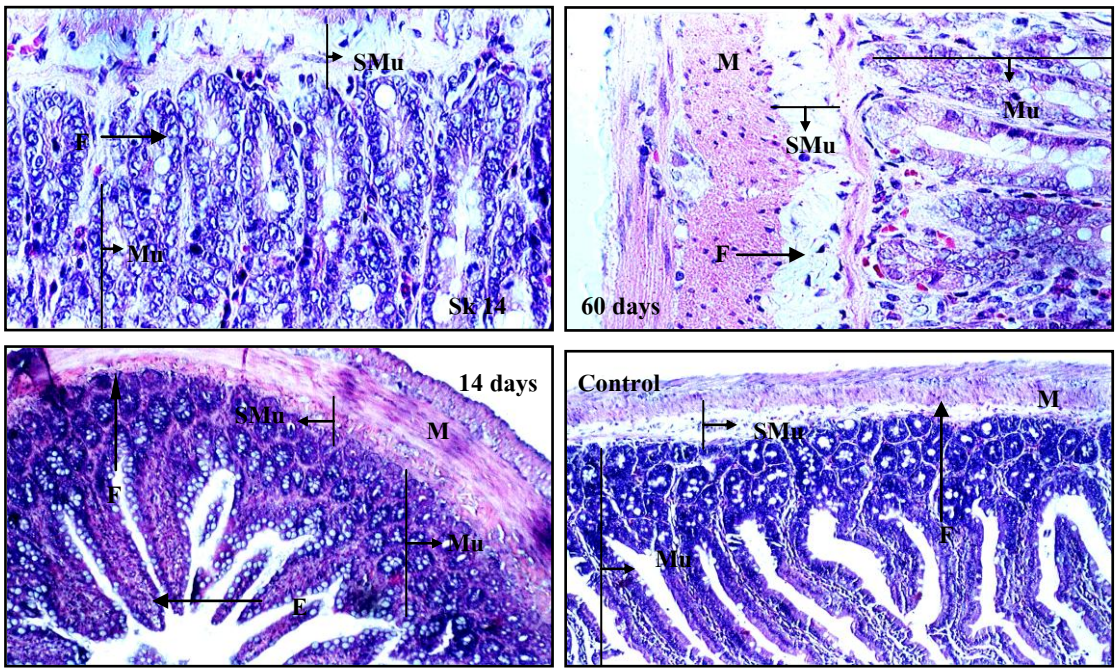
ตารางที่ 12 น้ำหนักหนูนอรเวเฉลี่ยและปริมาณอาหารที่หนูกิน หลังจาก 2 สัปดาห์ที่หนูได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากและทางผิวหนังทั้งชนิดสารแขวนลอยและอนุภาคไวรัสที่ไม่มีโปรตีนห่อหุ้มอัตรา $2x10^9$ ผลึก/ มล. และน้ำเกลือ 1% ในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ปี 2544-2546

กลุ่มทดลอง	น้ำหนักหนูเฉลี่ย [1/] (กรัม)	ปริมาณอาหารเฉลี่ย (กรัม)
ไวรัสเอ็นพีวีทางปาก	149.40±31.58 a	115.59±7.08
	(115.1-177.18)	(107.59-121.02)
น้ำเกลือทางปาก	149.72±15.36 a	121.14±9.24
	(122.1-171.88)	(111.58-130.02)
สารแขวนลอยไวรัสทางผิวหนัง	136.96±34.15 ab	118.27±0.58
	(103.74-171.97)	(118.02-119.21)
อนุภาคไวรัสที่ไม่มีโปรตีนทางผิวหนัง	144.67±31.78 ab	108.71±9.51
	(114.1-177.5)	(97.93-115.9)
น้ำเกลือทางผิวหนัง	133.26±42.49 b	108.71±10.25
	(89.5-174.4)	(96.88-114.92)
CV (%)	5.1	7.1

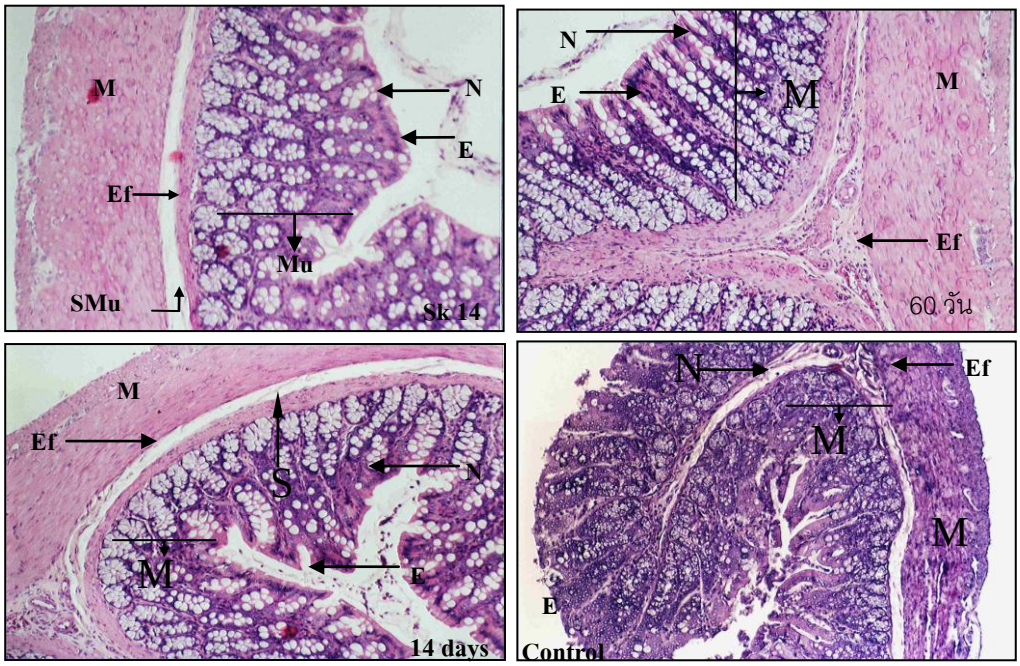
1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



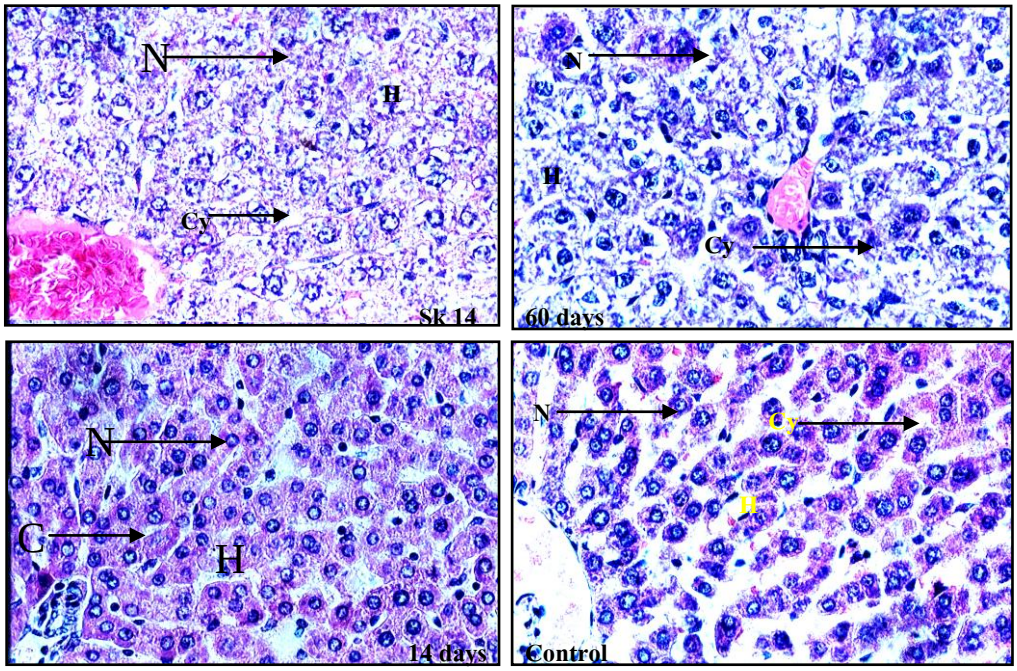
ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง 14 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม E = เซลล์เยื่อบุผิว F= เซลล์ไฟเบอร์ M= เซลล์กล้ามเนื้อ, Mu= ชั้นกล้ามเนื้อ SMu = ชั้นใต้ชั้นกล้ามเนื้อ และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



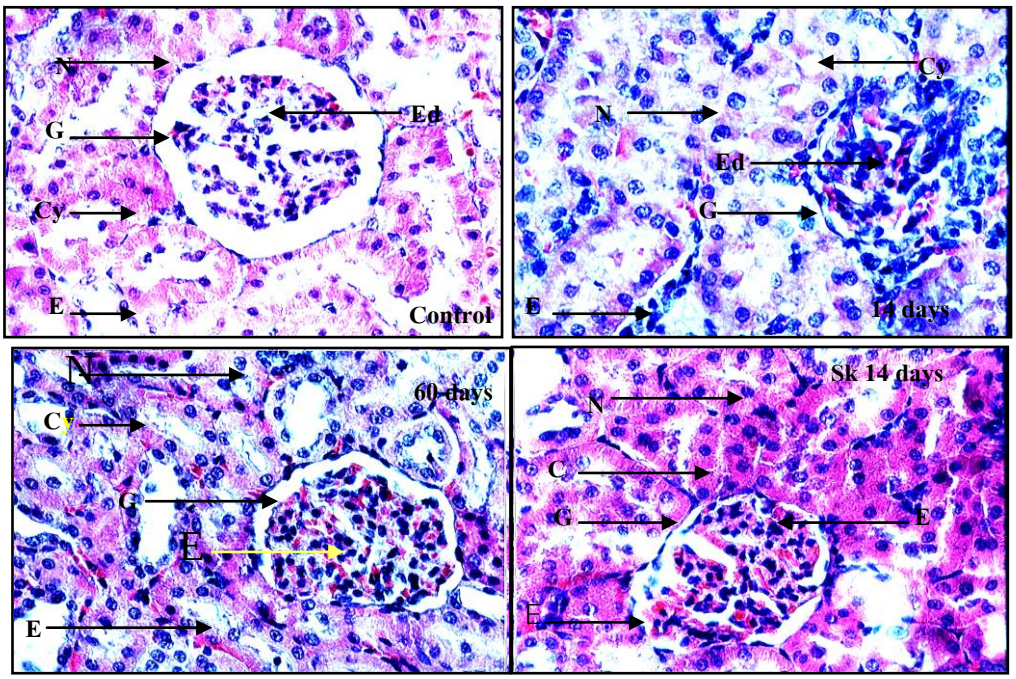
ภาพที่ 2 เนื้อเยื่อลำไส้เล็กของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปาก อัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วันและหลังทาผิวหนัง 14 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม E= เซลล์เยื่อบุผิว F= เซลล์ไฟเบอร์ M= เซลล์กล้ามเนื้อ Mu = ชั้นกล้าม เนื้อ N= นิวเคลียส SMu=ชั้นใต้ชั้นกล้ามเนื้อ และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



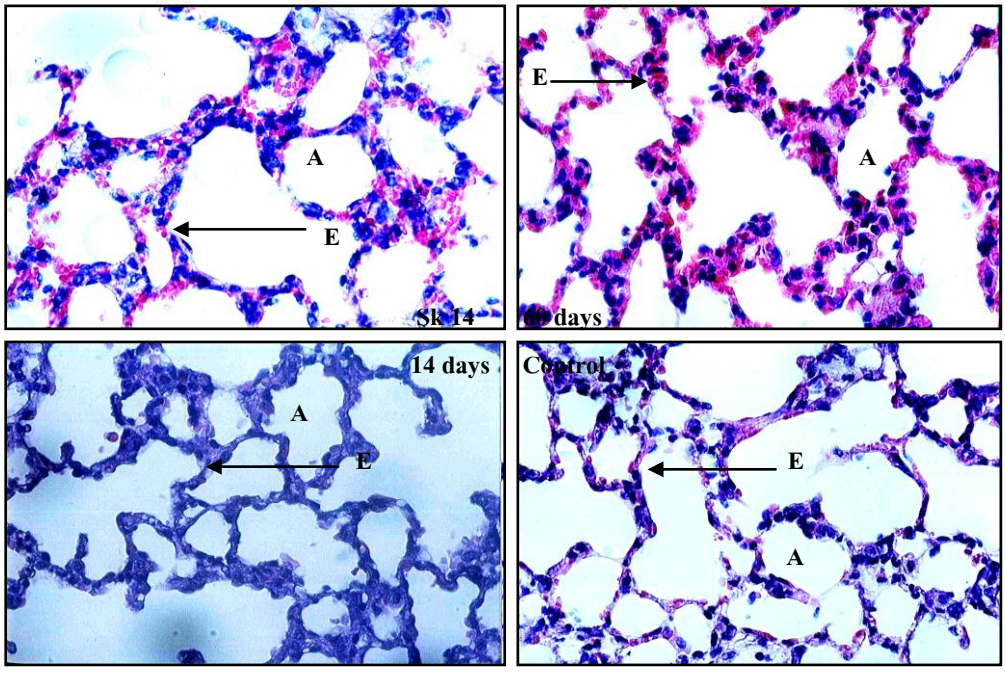
ภาพที่ 3 เนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา2 x10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง 14 วันเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม E=เซลล์เยื่อบุผิว F=เซลล์ไฟเบอร์ Ef =เซลล์ไฟเบอร์ชนิดยืดหยุ่น M=เซลล์กล้ามเนื้อ Mu =ชั้นกล้ามเนื้อ N= นิวเคลียส SMu= ชั้นใต้ชั้นกล้ามเนื้อ และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



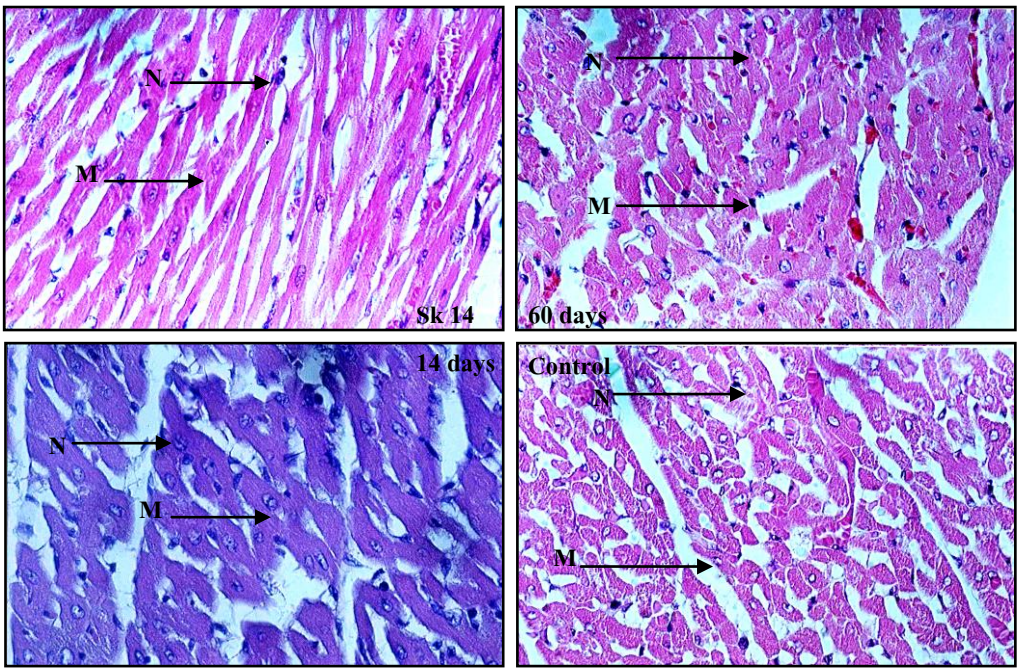
ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อตับของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง 14 วันเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม Cy =ไซโตพลาสซึม H= เซลล์ตับ N= นิวเคลียส และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและ อีโอซิน



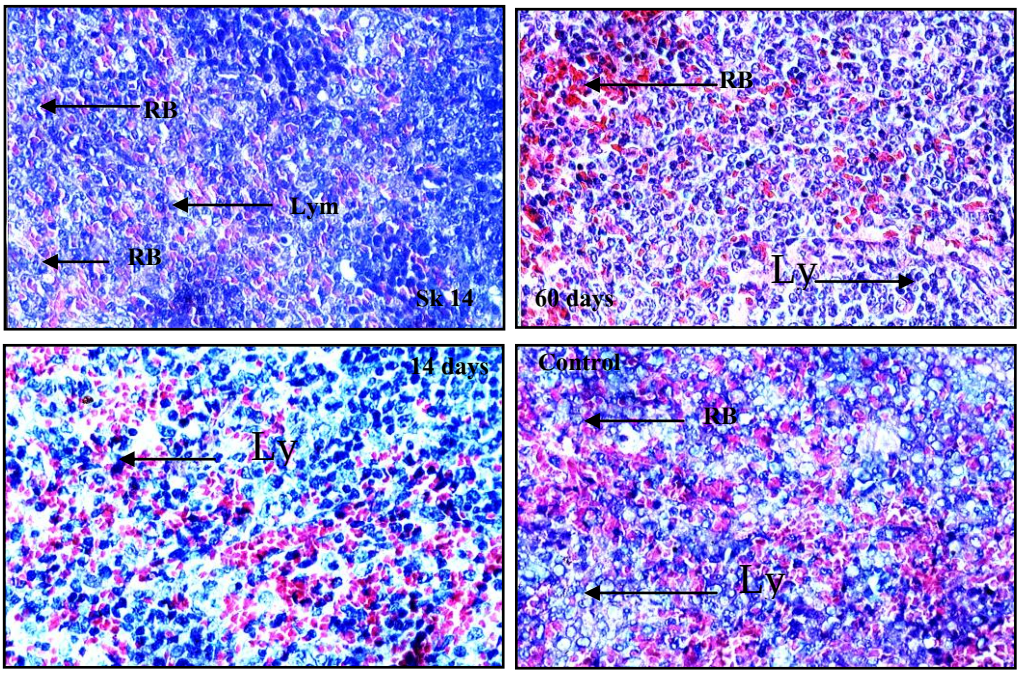
ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อไตของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วันและหลังทาผิวหนัง 14 วันเปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุม B = โบว์แมนแคบซูล Cy = ไซโตพลาสซึม E = เยื่อบุผิว Ed = เซลล์เยื่อบุผิวเส้นเลือดฝอย G = กลุ่มขดเส้นเลือดฝอย N = นิวเคลียส และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



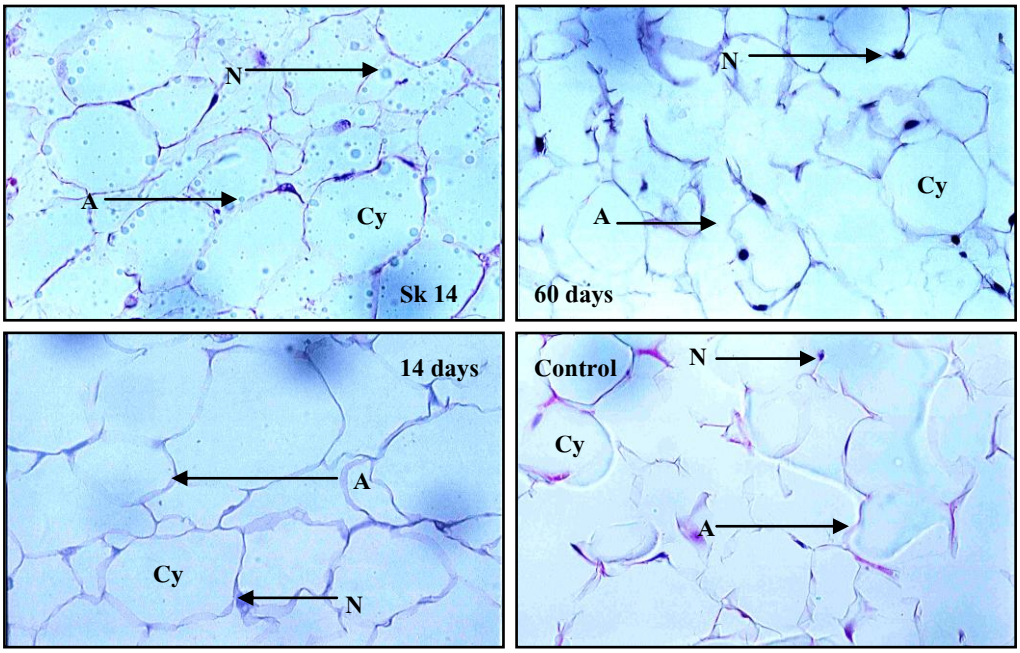
ภาพที่ 6 เนื้อเยื่อปอดของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม A = ถุงลมปอด, E= เยื่อบุผิวของถุงลมปอด และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



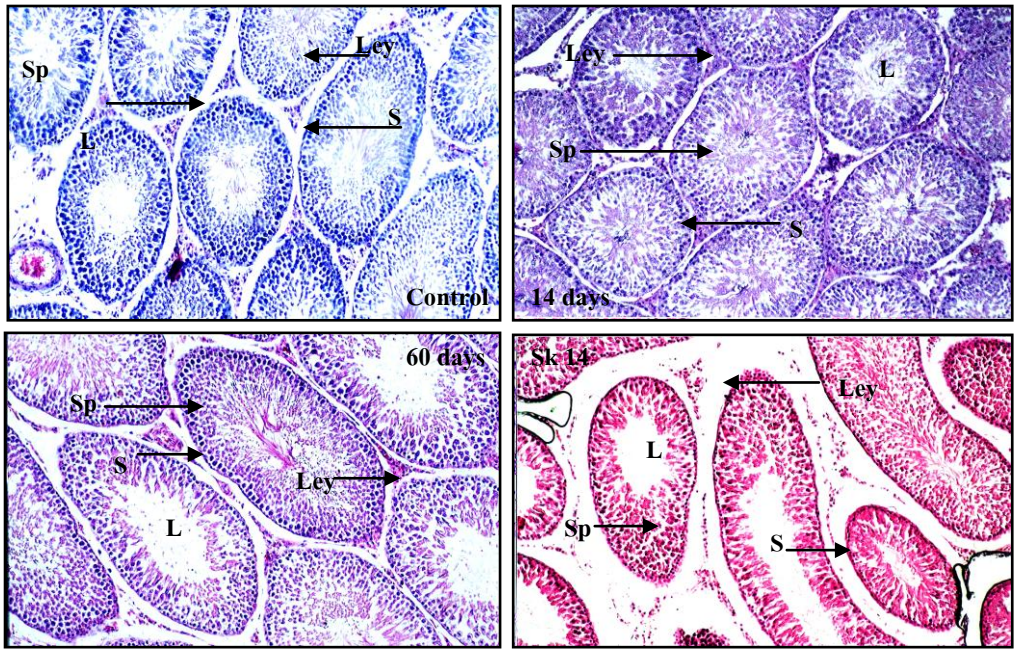
ภาพที่ 7เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปาก อัตรา 2 x 10^9ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง14 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Cy =ไซโตพลาสซึม M = เซลล์กล้ามเนื้อ N =นิวเคลียสและย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



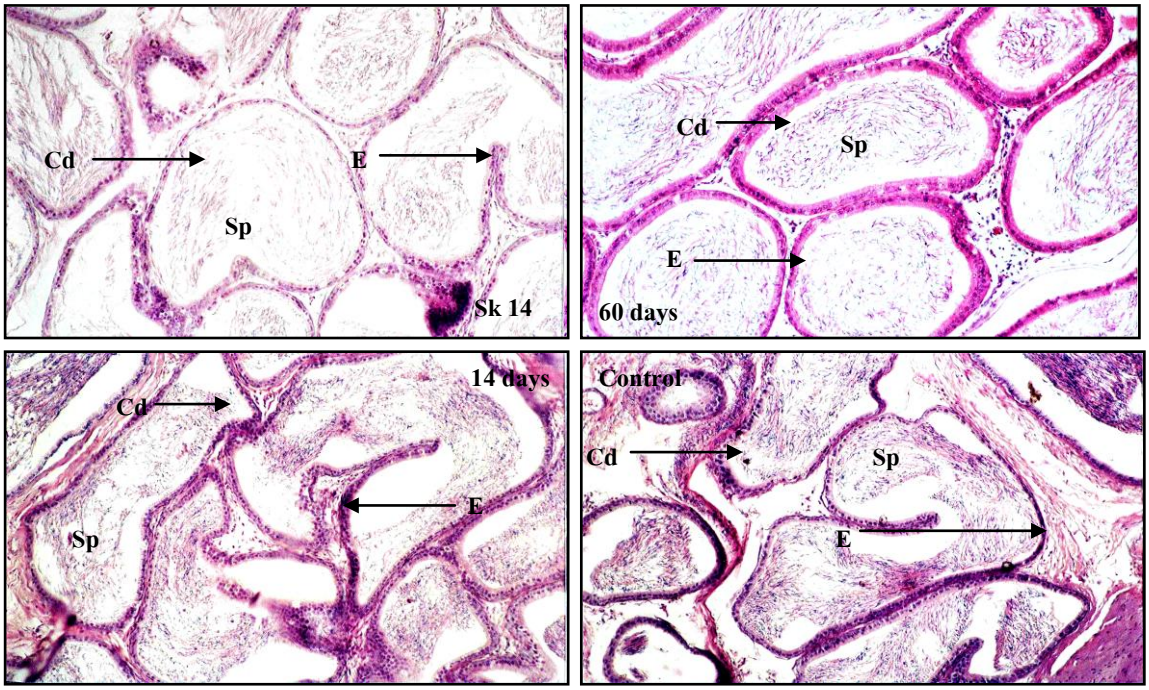
ภาพที่ 8 เนื้อเยื่อม้ามของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา2 x10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม Lym = เซลล์เม็ดเลือดขาว RCB = เซลล์เม็ดเลือดแดง และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและ **อีโอซิน**



ภาพที่ 9 เนื้อเยื่อไขมันของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และหลังทาผิวหนัง 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม A = เซลล์ไขมัน Cy =ไซโตพลาสซึม N = นิวเคลียส และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน

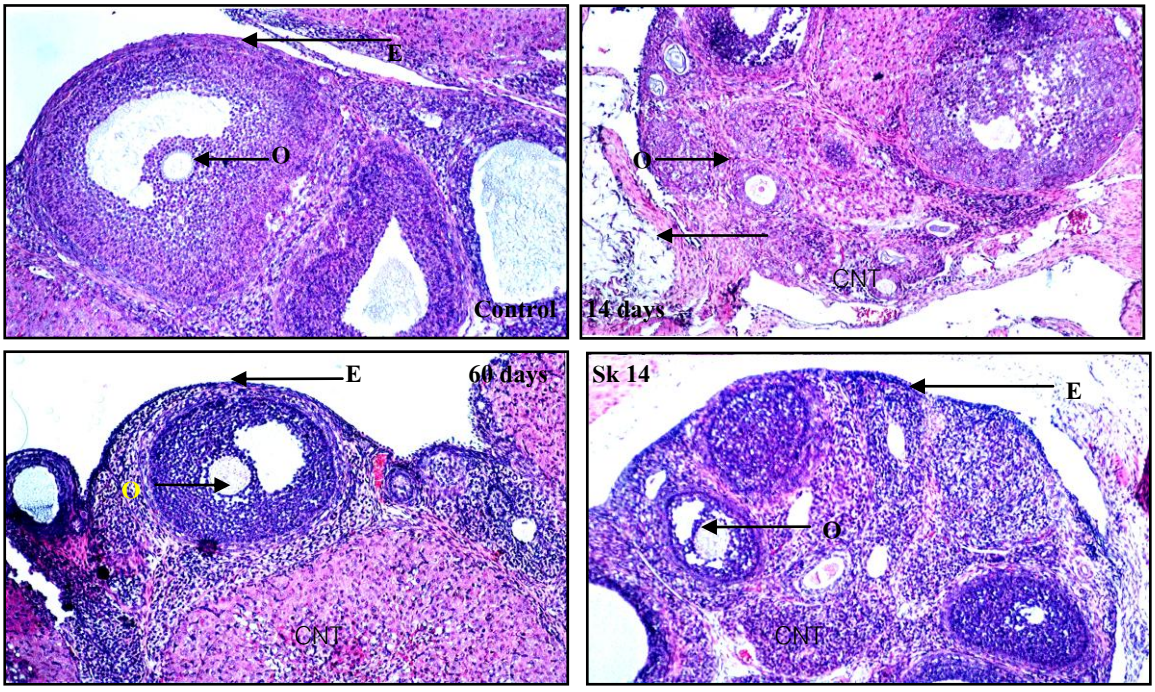


ภาพที่ 10 เนื้อเยื่ออัณฑะของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตร เป็นเวลา 14 วัน, 60 วันและหลังทาผิวหนัง 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม L = ช่องว่างภายในท่อผลิตอสุจิ Ley = เซลล์ผลิตฮอร์โมนเพศ S = ท่อผลิตอสุจิ Sp = อสุจิ และ ย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน



ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อท่อพักอสุจิของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตรเป็นเวลา 14 วัน 60 วัน และ หลังทาผิวหนัง 14 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Cd = ท่อพักอสุจิ E = เซลล์เยื่อบุผิว Sp = อสุจิ



ภาพที่ 12 เนื้อเยื่อรังไข่ของหนูนอรเวหลังได้รับเชื้อไวรัสเอ็นพีวีของหนอนเจาะสมอฝ้ายทางปากอัตรา 2 x 10^9 ผลึก/มิลลิลิตรเป็นเวลา 14 วัน, 60 วันและหลังทาผิวหนัง 14 วันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

CNT = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน E = เซลล์เยื่อบุผิว และย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน

โรงงานต้นแบบผลิตเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

Pilot Plant for *Bacillus thuringiensis* Production

อัจฉรา ตันติโชดก อิศเรศ เทียนทัด
เพ็ญลักษณ์ ชูดี อุทัย เกตุนุติ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การผลิตขยายเชื้อ *Bacillus thuringiensis* โดยใช้ ปลาน้ำ (fish soluble extract) จากโรงงานผลิตปลากระป๋องและ dextrose ในถัง fermenter ขนาดจุ 500 ลิตร การทดลองใช้ปลาน้ำ และ dextrose เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 5 สูตร ปลาน้ำ+dextrose 10+5 กรัม, 10+10 กรัม, 12+10 กรัม, 12+15 กรัม และ 15+20 กรัม อาหารทั้ง 5 สูตรเติม in organic salts $MgSO_4$ 1.75 กรัม, K_2HPO_4 1.75 กรัม, KH_2PO_4 1.75 กรัม, $CaCl_2$ 0.07 กรัม, $MnSO_4$ 0.05 กรัม และ $FeSO_4$ 0.03 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด 23.67, 25.33, 24.00, 25.00 และ 26.67 ชั่วโมงตามลำดับ ระยะเวลาสร้างสปอร์และสารพิษ28.67, 30.33, 29.00, 30.00 และ 32.67 ชั่วโมงตามลำดับ สปอร์มีน้ำหนักแห้ง 3.41, 3.47, 4.25, 4.67 และ 4.18 กรัม/ลิตร ได้ปริมาณสปอร์ $23.89x10^6$, $44.76 x10^6$, $30.54 x10^6$, $37.09 x10^6$ และ $31.83 x10^6$ CFU/มล. ได้ทำการทดลองโดยเพิ่มเติม dextrose หลังจากปลูกเชื้อ จากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ปลาน้ำ /dextrose อัตรา 12/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ไม่เติม dextrose, ปลาน้ำ/dextrose 12/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 1 ก.ก. 2 ครั้ง ที่ 5 และ 7 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ , ปลาน้ำ/dextrose 15/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose อัตรา 1 ก.ก. 3 ครั้ง ที่ 5, 7 และ 9 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ , ปลาน้ำ/dextrose 15/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 5 ครั้ง ที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ ใช้ระยะเวลาเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด 23.33, 23.33, 24.00 และ 27.66 ชั่วโมง ระยะเวลาที่ใช้สร้างสปอร์และสารพิษ 29.33, 28.66, 31.00 และ 33.00 ชั่วโมงตามลำดับ ให้ผลผลิตสปอร์ $38.22 x 10^6$, $44.76 x 10^6$, $53.35 x 10^6$ และ $66.63 x 10^6$ CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ได้น้ำหนักแห้งของผลผลิต 4.10, 4.24, 4.65 และ 4.93 กรัม/ลิตรตามลำดับ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 42 06 003 013

คำนำ

โรงงานต้นแบบผลิตเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ได้รับงบประมาณจากกรมวิชาการเกษตรให้ดำเนินการสร้างเพื่อผลิตขยายเชื้อได้สร้างเสร็จและเริ่มดำเนินการผลิตในปี พ.ศ. 2538 จุดประสงค์สำคัญของการผลิตเชื้อ *B. thuringiensis* เพื่อนำไปใช้เพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ภายใต้โครงการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานจากการดำเนินการผลิตเชื้อมาระยะหนึ่งได้พบปัญหาในระบบการผลิต เนื่องจากได้ทำการสร้างถังหมักเชื้อขึ้นเองสามารถผลิต *B. thuringiensis* ได้ผลผลิตต่ำกว่าที่ควรจะเป็น มักประสบปัญหาการปนเปื้อนและต้องเปิดถังทำความสะอาดบ่อยครั้ง จึงได้ดำเนินการแก้ไขและทำการปรับปรุงระบบการผลิตของถังหมักเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร ในปี พศ. 2542 ได้ขอความร่วมมือจากสถาบันพัฒนาและฝึกอบรมโรงงานต้นแบบ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินการปรับปรุงแก้ไข จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพและกรมวิชาการเกษตร ได้ดำเนินการเปลี่ยนระบบส่งกำลังเพลาขับใบพัดกวน จากเดิมใช้ระบบมอเตอร์หมุนแผ่นแม่เหล็กเหนี่ยวนำ 2 ชุด จากด้านล่างของก้นถัง เปลี่ยนเป็นการใช้มอเตอร์ขับหมุนเพลาจากบริเวณด้านบนของฝาถัง โดยเปลี่ยนฝาถังใหม่ และใช้ระบบ mechanical seal ระหว่างมอเตอร์ขับเคลื่อนกับแกนเพลาภายในถังเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำการติดตั้งครีบ (baffle) ขนาดกว้าง 4 เซนติเมตร ยาว 1 เมตร ภายใน ถังจำนวน 4 อัน ระยะห่างเท่ากัน เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลาย O_2ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนระบบ air filter จาก 1 ชุด เป็น 2 ชุด เปลี่ยนระบบจ่ายอากาศบริเวณก้นถังโดยใช้ท่อสแตนเลสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3/8 นิ้ว เจาะรูบริเวณด้านล่างของท่อทำมุม 60 องศากับก้นถัง เจาะรูจำนวน 30 จุด จากเดิมท่ออากาศมีหัวจ่ายอากาศอยู่ด้านบนของท่อจำนวน 12 จุด เปลี่ยนขนาดของช่องเปิดใส่เชื้อบนฝาถังจาก ½ นิ้ว เป็น 1½ นิ้ว ได้ดำเนินการปรับปรุงถังหมักเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร เสร็จในเดือนกันยายน 2542 ทำการทดลองเครื่องจนพร้อมที่ดำเนินการผลิตได้ จากปัญหาของการผลิตด้วย ปลาป่นและถั่ว เหลืองป่น ซึ่งมีราคาถูก แต่ขั้นตอนในการเตรียมค่อนข้างยุ่งยาก โดยต้องนำมาต้มและกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำส่วนของปลาป่นและถั่วเหลืองขนาดใหญ่ทิ้งไป สิ้นเปลืองแรงงาน จึงได้เปลี่ยนมาทดลอง ใช้ปลาน้ำ (fish sotuble extract) ที่สกัดจากโรงงานปลาทูน่ากระป๋อง และใช้น้ำตาล dextrose ซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมที่เชื้อ Bt สามารถนำไปใช้ได้รวดเร็วกว่า molasses และไม่มีปัญหาเรื่องคราบเกาะผนังของ ถังหมักเชื้อนำมาใช้ทำการผลิตทดแทนปลาป่นและถั่วเหลืองป่น

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาการใช้ปลาน้ำ และ dextrose เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตขยาย *B. thuringiensis*
2. ศึกษาข้อมูลของระบบการผลิตของถังหมักเชื้อ เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการผลิต สปอร์และสาร toxin ของเชื้อ *B. thuringiensis*

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถังหมักเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร
2. เครื่องกำเนิดไอน้ำขนาด 100 แรงม้า
3. เครื่องปั๊มอากาศขนาด 6.5 แรงม้า
4. เครื่องควบคุมอุณหภูมิในถังหมักเชื้อ
5. ถังผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. ถังพลาสติกเก็บเชื้อ
7. เครื่องเขย่า
8. เชื้อ *Bacillus thuringiensis*
9. ตู้เขี่ยเชื้อ
10. กล้องจุลทัศน์
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง เครื่องวัดการละลาย O_2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
12. autoclave และ retort
13. moisture analysis
14. อาหารเลี้ยงเชื้อใช้ปลาน้ำ (fish soluble extract) , dextrose, nutrient agar, nutrient broth, $MgSo_4$, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $MnSO_4$, $CuSo_4$ และ $FeSO_4$
15. เครื่องแก้ว สไลด์ และอุปกรณ์จำเป็น
16. เครื่องกรองน้ำชนิด reverse osmosis
17. สารลดการเกิดฟอง silicone
18. lactic acid, potassium sorbate

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การผลิตขยายเชื้อ *Bacillus thuringiensis* โดยใช้ปลาน้ำ (fish soluble) และ dextrose ทำการทดลองผลิตขยายเชื้อ Bt โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 5 วิธีการ วิธีการละ 3 ซ้ำ ดังนี้

1. ใช้ปลาน้ำ อัตรา 10 กรัม/ลิตร และ dextrose อัตรา 5 กรัม/ลิตร
2. ใช้ปลาน้ำ อัตรา 10 กรัม/ลิตร และ dextrose อัตรา 10 กรัม/ลิตร
3. ใช้ปลาน้ำ อัตรา 12 กรัม/ลิตร และ dextrose อัตรา 10 กรัม/ลิตร
4. ใช้ปลาน้ำ อัตรา 12 กรัม/ลิตร และ dextrose อัตรา 15 กรัม/ลิตร
5. ใช้ปลาน้ำ อัตรา 15 กรัม/ลิตร และ dextrose อัตรา 20 กรัม/ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรผสม $MgSO_4$ 1.75 กรัม/ลิตร, K_2HPO_4 1.75 กรัม/ลิตร KH_2PO_4 1.75 กรัม/ลิตร, $CaCl_2$ 0.07 กรัม/ลิตร $MnSO_4$ 0.05 กรัม/ลิตร และ $FeSO_4$ 0.03 กรัม/ลิตร (ตารางที่1) ระบบการผลิตในถังหมักเชื้อแสดงอยู่ใน ตารางที่2

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เตรียมเชื้อ Bt เพื่อเตรียม seed inoculum โดยทำการเขี่ยแยกเชื้อ Bt จากสต็อกที่เก็บไว้ใน slant agar ลงใน slant ของ nutrient agar จำนวน 20 หลอด นำไปเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง

2. เตรียม nutrient broth อัตรา 8 กรัม/น้ำ 1 ลิตร จำนวน 10 ลิตร เคี่ยวจน nutrient broth ละลายจากนั้นบรรจุลงใน flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 250 มิลลิลิตร ต่อ flask จำนวน 40 flask ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที เมื่อครบกำหนด นำออกมาวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง ทำการเขี่ยเชื้อ Bt จาก slant ลงไปใน flask จำนวน 2 loops/flask ในตู้เขี่ยเชื้อ นำ flask ไปเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 80 รอบต่อนาที นาน 18 ชั่วโมง

3. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเชื้อทำการผสมปลายน้ำ dextrose และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามตารางที่ 1 ลงในถังผสมอาหารขนาดจุ 80 ลิตร โดยใช้น้ำกรอง ใช้ไม้พายกวนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมให้เข้ากับน้ำ จากนั้นใช้เครื่องปั๊มขนาด 1 นิ้ว ดูดส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ถังหมักเชื้อทางช่องเปิดด้านบนของฝาถังเติมน้ำจนครบ 350 ลิตร เดินเครื่องใบพัดกวนของถังหมักปรับ pH ให้ได้ 7.2 จากนั้นทำการปิดฝาช่องเทอาหาร

4. ทำการนึ่งฆ่าเชื้อในถังหมัก โดยผ่านไอน้ำจากเครื่องกำเนิดไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาลดอุณหภูมิของถังหมักเชื้อ โดยผ่านน้ำเย็นจาก chiller ผ่านช่องว่างที่ห่อหุ้มถังประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยทิ้งค้างคืนไว้ 18 ชั่วโมง

5. การปลูกเชื้อในถังหมักเชื้อ รวบรวม starter ใน flask เมื่อเขย่าครบ 18 ชั่วโมง เทรวมใน flask ขนาดจุ 5 ลิตร จำนวน 2 flask โดยทำการเทในตู้เขี่ยเชื้อ เปิดฝาช่องเปิดเทอาหารบนฝาถัง ใช้แอลกอฮอร์ 95% เช็ดรอบช่องเปิดและใช้สำลีชุบแอลกอฮอร์วางล้อมช่องเปิด จุดไฟที่สำลีก่อนเท starter ลงสู่ถังหมักเชื้อ ทำการปิดฝาช่องเปิดให้สนิทเดินเครื่องกวนของถังหมัก ใช้ความเร็วรอบของใบพัดกวนภายในถัง 270 รอบต่อนาที อัดอากาศเข้าสู่ถังที่ 0.75 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

6. เมื่อเกิดฟองภายในถังหมักเชื้อถึงระดับ คอของถังหมักเชื้อ ใช้ silicone อัตรา 100 – 500 มิลลิลิตร เติมลงในถังหมักเชื้อเพื่อลดฟอง และลดปริมาณอากาศที่อัดเข้าถัง

7. การตรวจดูการเจริญเติมโตของเชื้อ Bt ในถังหมักโดยการเก็บตัวอย่างเชื้อจากท่อเปิดก้นถัง นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ การเก็บตัวอย่างเริ่มทำหลังจากปลูกเชื้อ 6 ชั่วโมง และทำการตรวจสอบทุกชั่วโมงหลังจากการปลูกเชื้อ 20 ชั่วโมง จนกระทั้งสิ้นสุดขบวนการหมักเชื้อ

8. การตรวจนับการแตกตัวของเซลล์ของ Bt โดยทำ wet mount แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์เมื่อพบเซลล์แตกเกิน 80 เปอร์เซ็นต์ จึงยุติขบวนการหมักในถังหมักและเก็บเชื้อ Bt ออกจากถังหมักเชื้อ

9. การเก็บเชื้อBt ออกจากถังหมักเชื้อ บรรจุในถังพลาสติกขนาด 80 ลิตร พร้อมฝาปิด ผสมสาร preservative โดยใช้ lactic acid และ potassium sorbate อัตรา 0.3% (W/V) เติมลงในเชื้อBt ที่ผลิตได้กวนให้เข้ากัน จากนั้นปิดฝา เพื่อรอนำไปทำสูตรสำเร็จต่อไป
10. การตรวจนับปริมาณสปอร์ที่ผลิตได้จากถังหมักเชื้อ นำตัวอย่างมาแช่น้ำน้ำร้อนที่80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อทำลาย vegetative cells นำไปทำ serial dilution ก่อนนำไป spread plate บน nutrient agar ใช้อัตรา 0.2 มิลลิลิตร/petridish นำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับจำนวนโคโลนีของ Bt

การทดลองที่ 2 การผลิตขยายเชื้อ *B. thuringiensis* โดยใช้ปลาน้ำ (fish soluble) และน้ำตาล dextrose เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทำการเติม dextrose อัตรา 1 กิโลกรัมต่อครั้งหลังปลูกเชื้อระยะเวลาต่างๆ กัน โดยทำการทดลองผลิตเชื้อBt จากอาหารเลี้ยงเชื้อ2 สูตร มี 4 วิธีการทดลอง 4 วิธีการๆ ละ 3 ซ้ำ ดังนี้

1. ปลาน้ำ/ dextrose อัตรา 12/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ไม่เติม dextrose หลังจากปลูกเชื้อ
2. ปลาน้ำ/ dextrose อัตรา 12/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose ครั้งละ 1 กก. จำนวน 2 ครั้ง หลังปลูกเชื้อ 5 และ 7 ชั่วโมง
3. ปลาน้ำ/ dextrose อัตรา 15/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose ครั้งละ 1 กก. จำนวน 3 ครั้ง หลังปลูกเชื้อ 5, 7 และ 9 ชั่วโมง
4. ปลาน้ำ/ dextrose อัตรา 15/10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร เติม dextrose ครั้งละ 1 กก. จำนวน 5 ครั้ง หลังปลูกเชื้อ 5, 7, 9, 11 และ 13 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ

ทุกวิธีการทดลองเติม $MgSO_4$ 1.75 กรัม/ลิตร, K_2HPO_4 1.75 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 1.75 กรัม/ลิตร, $CaCl_2$ 0.07 กรัม/ลิตร, $MnSO_4$ 0.07 กรัม/ลิตร และ $FeSO_4$ 0.03 กรัม/ลิตร ส่วนประกอบของแต่ละสูตร แสดงอยู่ใน ตารางที่ 2

ขั้นตอนการดำเนินงาน

ดำเนินการทุกอย่างเหมือนการทดลองที่ 1 ทุกประการ การเตรียม dextrose เพื่อเติมในถังหมักเชื้อหลังจากการปลูกเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ทำการละลายน้ำตาล จำนวน1 กิโลกรัม ในน้ำ 3 ลิตร โดยใช้ความร้อนช่วย จากนั้นเทลง flask ขนาดจุ 5 ลิตร ปิด flask ด้วยสำลีปิดให้สนิทนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และปล่อยให้อุณหภูมิลดลง ก่อนที่จะนำไปใส่ถังหมักเชื้อการใช้ silicone เพื่อลดการเกิดฟองต้องนำ silicone มาใส่ flask ขนาดจุ 1 ลิตร เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อก่อนใช้

การบันทึกข้อมูล

ระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ การสร้างสปอร์และสาร toxin เซลล์แตกตัว จำนวนสปอร์ที่ผลิตได้ น้ำหนักแห้งของ Bt ที่ผลิตได้ การเปลี่ยนแปลงของระบบภายในถังหมักเชื้อตลอดระยะเวลาการผลิตเชื้อในถังหมักเชื้อ

ระยะเวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2542 – กันยายน 2546

สถานที่ ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่
และกองกีฏและสัตววิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1. การผลิต *B. thuringiensis* โดยใช้ปลาน้ำและ dextrose

การใช้ปลาน้ำ และ dextrose เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 5 สูตร ได้แก่ ปลาน้ำ/ dextrose อัตรา 10/5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร, 10/10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร, 12/10 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร, 12/15 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร และ 15/20 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ในการผลิตขยายเชื้อ Bt พบว่าใช้ระยะเวลาในการสร้างเซลล์สูงสุด 23.67, 25.33, 24.00, 25.00, และ 26.67 ชั่วโมงตามลำดับ ระยะเวลาสร้างสปอร์และสาร toxin และเซลล์แตกตัว 28.66, 28.33, 29.00, 30.00, และ 32.67 ชั่วโมงตามลำดับ ให้น้ำหนักแห้งของสปอร์ และสาร toxin จำนวน 3.41, 4.25, 4.25, 4.67 และ 4.18 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ได้ปริมาณของสปอร์จำนวน $23.89x10^6$, $44.76x10^6$, $30.54x10^6$, $37.09x10^6$ และ$31.83x10^6$ colony forming units/ml(CFU/ml)ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ ปลาน้ำ dextrose เมื่อเพิ่มอัตราของ dextrose จาก 10/5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตรเป็น 10/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ระยะเวลาที่ใช้ในการสร้างเซลล์สูงสุด เพิ่มขึ้นจาก 23.67 ชั่วโมงเป็น 25.33 ชั่วโมง ระยะเวลาการสร้างสปอร์และสาร Toxin จนเซลล์แตก เพิ่มขึ้นจาก 28.66 ชั่วโมง เป็น 28.33 ชั่วโมง ขณะเดียวกันพบว่า ปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นจาก $23.89x10^6$ CFU/มล. เป็น 44.76 CFU/มล. ขณะที่น้ำหนักแห้งของผลผลิต Bt อยู่ที่ 3.41 และ 3.46 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของปลาน้ำ/dextrose เป็น 12/10 และ 12/15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ระยะเวลาที่ใช้สร้างเซลล์สูงสุดและสปอร์เพิ่มขึ้นจาก 24.00 เป็น 25.00 ชั่วโมง ระยะเวลาการสร้างสปอร์และสารtoxin จนเซลล์แตกอยู่ที่ 29.00และ 30.00 ชั่วโมง ให้ผลผลิต สปอร์เพิ่มขึ้นจาก $30.54x10^6$ CFU/มล. เป็น $37.09x10^6$ CFU/มล. เมื่อเพิ่มปลาน้ำ ที่อัตรา 15/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ระยะเวลาการใช้สร้างเซลล์สูงสุด และระยะเวลาที่ใช้สร้างสปอร์ เพิ่มขึ้นเป็น 26.67 และ 32.67 ชั่วโมง แต่ผลผลิต สปอร์และน้ำหนักแห้งกลับลดลงที่ $31.76 x10^6$ CFU/มล. และ 4.18 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณของ dextrose ระยะเวลาในการเจริญเติมโตทวีจำนวน เซลล์ และระยะเวลาที่ใช้สร้างสปอร์จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มจำนวนปลาน้ำจาก10 กรัมเป็น 12 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ปริมาณของสปอร์ที่ผลิตได้จะเพิ่มสูงขึ้น พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ ปลาน้ำ /dextrose อัตรา 12/15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร จะให้ผลผลิตสปอร์สูงสุดที่ $37.09x10^6$ CFU/มล แต่เมื่อเพิ่มปลาน้ำ/dextrose อัตรา 15/20 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร กลับได้ผลผลิตสปอร์ลดลง$31.76x10^6$ CFU/มล. เมื่อความเข้มข้นของ dextrose ต่อลิตร สูงจะเป็น สาเหตุที่ทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ Bt หยุดชงักหรือลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเปอร์เซ็นต์ของ dextrose สูงขึ้นเกิดการ oxidation มากขึ้นจะเกิดสภาพความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ pH ลดต่ำลงจะส่งผลกระทบต่อการ

ทวีจำนวนเซลล์ของ Bt นอกจากนั้นในสภาพของอาหารที่มี pH ต่ำ by product จากขบวนการ oxidation ถ้าเกิดขึ้นมากก็จะส่งผลต่อความสามารถในการสร้างสปอร์และสาร toxin ของ Bt ด้วย ดังนั้นจำเป็นต้องทำการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อขณะที่ดำเนินการผลิตให้อยู่ที่ระดับ 6.5 – 7.0

ผลจากการทดลองใช้ปลาน้ำและ dextrose พบว่ามีความสะดวกในการเตรียม และไม่เกิด ปัญหาการเกาะติดถังหมักเชื้อล้างทำความสะอาดได้ง่ายกว่าวิธีการเดิมซึ่งใช้ ปลาป่นและ molasses การใช้ปลาน้ำ/dextrose อัตรา 12/15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร สามารถผลิตให้สปอร์สูงสุดที่ 37.09×10^6 CFU/มล

การทดลองที่ 2. การผลิต *B. thuringiensis* โดยใช้ปลาน้ำ dextrose และเติม dextrose หลังจากปลูกเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

จากผลการทดลอง ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ปลาน้ำ /dextrose อัตรา 12/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ไม่เติม dextrose, อัตรา 12/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 2 ครั้ง, อัตรา 15/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 3 ครั้ง, และอัตรา 15/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เติม dextrose 5 ครั้ง พบว่าใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด 23.33, 23.33, 24.00 และ 27.60 ชั่วโมง ใช้เวลาสร้างสปอร์และสาร toxin 29.33, 28.66, 31.00 และ 33.00 ชั่วโมงตามลำดับ สามารถผลิตสปอร์ได้จำนวน 38.22×10^6, 44.76×10^6, 53.35×10^6, และ 66.63×10^6 CFU/มล. ตามลำดับ ให้น้ำหนักแห้งของมวลสาร (biomass) 4.10, 4.80, 4.93 และ 4.93 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ อัตรา 12/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร การไม่เติม dextrose กับเติม dextrose 2 ครั้งที่ 5 และ 7 ชั่วโมง หลังปลูกเชื้อพบว่า ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดและการสร้างสปอร์ใกล้เคียงกัน แต่การเติม dextrose ให้ผลผลิตสปอร์ 44.76×10^6 CFU/มล. เมื่อเปรียบเทียบการใช้สูตรอาหารอัตรา 12/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เติมน้ำตาล dextrose 2 ครั้ง กับสูตร 15/10 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร เติมน้ำตาล dextrose 3 ครั้ง พบว่า ระยะเวลาที่ใช้เพิ่มปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 23.33 และ 24.00 ชั่วโมง ระยะเวลาสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นจาก 28.66 เป็น 31.00 ชั่วโมง ขณะเดียวกันการเพิ่มปลาน้ำและเพิ่มจำนวนครั้งเติมน้ำตาล จาก 2 ครั้ง เป็น 3 ครั้ง สามารถผลิตสปอร์เพิ่มขึ้น 44.76×10^6 และ 53.35×10^6 CFU/มล. เมื่อเพิ่มจำนวนครั้งของการเติม dextrose เป็น 5 ครั้ง พบว่าระยะเวลาการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด เพิ่มขึ้น เป็น 27.60 ชั่วโมง ระยะเวลาการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้นเป็น 33.00 ชั่วโมง แต่สามารถให้ผลผลิตสปอร์สูงสุดที่ 66.63×10^6 CFU/มล. ให้น้ำหนักมวลสาร 4.93 กรัมต่อลิตร

การเปลี่ยนแปลงภายในถังหมักเชื้อของการทดลองเติม dextrose ลงในถังหมักเชื้อหลังจากปลูกเชื้อแล้ว ที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 ชั่วโมง วิธีการไม่เติม dextrose ใช้จำนวนรอบของใบพัดกวนของถังหมักเชื้อ 270 รอบ/นาที จนถึงชั่วโมงที่ 9 หลังจากปลูกเชื้อ จากนั้นจึงลดจำนวนรอบลงเหลือ 240 รอบ/นาที ใช้ปริมาณอากาศ 1 ก.ก./ซม^3 จำนวน 11 ชั่วโมง เมื่อปริมาณฟองในถังมากขึ้นจึงลดลงเหลือ 0.75 ก.ก./ซม^3 และมีการเติม anti foam จำนวน 20 มิลลิลิตร 2 ครั้ง ที่ 0 และ 16 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ (ตารางที่ 5) วิธีการเติม dextrose 2 ครั้ง ที่ 5 และ 7 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบว่าชั่วโมงที่ 6 หลังปลูกเชื้อ ลดจำนวนรอบของใบพัดลงเหลือ 240 รอบ/นาที ใช้ปริมาณอากาศ 0.75 ก.ก./ซม^3 ตลอดระยะเวลาการผลิตและมีการเติม anti foam จำนวน 200 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ที่ 0, 8 และ 14 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ (ตารางที่ 6) วิธีการเติม dextrose 3 ครั้ง ที่ 5,

7 และ 9 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อลดจำนวนรอบจาก 270 รอบ/นาที เป็น 240 รอบ/นาที ในชั่วโมงที่ 6 หลังปลูกเชื้อ ลดปริมาณอากาศจาก 1 ก.ก./ซม^3 เหลือ 0.75 ก.ก./ซม^3 ในชั่วโมงที่ 6 หลังปลูกเชื้อ ทำการเติม anti foam 4 ครั้ง ที่ 0, 6, 8 และ 10 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อในชั่วโมงที่ 8 เติม 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 7) วิธีการเติม dextrose 5 ครั้งที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ พบว่าลดจำนวนรอบใบพัดกวนที่ 240 รอบ/นาที ชั่วโมงที่ 6 ลดปริมาณอากาศจาก 1 ก.ก./ซม^3 เป็น 0.75 ก.ก./ซม^3 ชั่วโมงที่ 10 หลังปลูกเชื้อ และเติม anti foam จำนวน 4 ครั้ง ที่ 200, 200, 100 และ 200 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 9, 11 และ 13 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า การเพิ่มปริมาณของ dextrose ในระหว่างการเจริญเติมโตของ Bt ในช่วง log phase (ที่ 8-18 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ) สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ของ Bt ในช่วงการแบ่งตัว เพิ่มปริมาณเซลล์ จะส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตสปอร์ให้มากขึ้น ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งเดียวและเติมอาหารเพิ่มในขบวนการหมักเชื้อในลักษณะของ fed batch จะเป็นแนวทางที่จะเพิ่มขีดความสามรถของถังหมักเชื้อในการผลิต Bt ให้ได้ผลผลิตสปอร์สูงขึ้น ตามทฤษฎีถ้าสภาพแวดล้อมภายในถังสมบูรณ์ ถังหมักเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อสมบูรณ์ ควรจะผลิตสปอร์ได้ 10^9 CFU/มล. ในการทดลองครั้งนี้การเพิ่มปริมาณของ dextrose เพียงอย่างเดียวไม่น่าจะเหมาะสม ทั้งนี้เนื่องจากการเจริญเติมโตของ Bt ควรต้องมีอัตราส่วนของ C:N ratio ที่เหมาะสมด้วย การเติม dextrose หลังปลูกเชื้อจึงควรต้องเติม ปลาน้ำลงไปพร้อมๆ กัน แต่การเติมปลา น้ำ ปริมาณ และความถี่ในการเติม จึงเป็นต้องศึกษาทั้งนี้ เนื่องจากการเติมโปรตีนจากปลาน้ำ จะเกิดฟองในถังหมักมากขึ้นตามไปด้วย จึงมีความสัมพันธ์กับระบบการป้อนอากาศ ของถังหมักเชื้อและการเติม antifoam แต่อย่างไรก็ตามการปรับเพิ่มอัตราส่วนของ ปลาน้ำ /dextrose และการเพิ่มปริมาณของ ปลาน้ำ /dextrose หลังจากปลูกเชื้อในระยะเวลาที่เหมาะสม จะทำให้ถัง fermenter สามารถเพิ่มผลผลิตสปอร์ได้เพิ่มขึ้นกว่าการเติม dextrose เพียงอย่างเดียว

สรุปผลการทดลอง

การทดลองใช้ ปลาน้ำ /dextrose อัตราต่างๆ กัน 5 อัตรา เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักเชื้อขนาด 500 ลิตร พบว่าระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดใช้เวลา 23.67 – 26.67 ชั่วโมง ระยะเวลาที่ใช้สร้างสปอร์และสารtoxin 28.66 – 32.67 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณของ dextrose มีผลทำให้ระยะเวลาการทวีจำนวนเซลล์ และการสร้างสปอร์เพิ่มขึ้น มีผลทำให้การผลิตเชื้อ Bt ใช้เวลาเพิ่มขึ้นประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง พบว่าการใช้ปลาน้ำอัตรา 12 และ 15 กรัม/ลิตร เมื่อเพิ่มอัตรา dextrose จาก 15 กรัม/ลิตร เป็น 20 กรัม/ลิตร กลับทำให้ผลผลิตสปอร์ลดลง จาก 37.92 x 10^6 CFU/มล. เป็น 31.76 x 10^6 CFU/มล. การทดลองเติม dextrose อัตรา 1 ก.ก./ครั้งหลังการปลูกเชื้อ พบว่าการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและไม่เติม dextrose, เติม dextrose 2 ครั้ง, เติม dextrose 3 ครั้งและเติม dextrose 5 ครั้ง สามารถให้จำนวนผลผลิตสปอร์ 38.22 x 10^6, 44.76 x 10^6, 53.35 x 10^6 และ 66.63 x 10^6 CFU/มล.ตามลำดับ โดยการเติม dextrose หลังปลูกเชื้อแล้วให้ผลผลิตสปอร์และสาร toxin สูงกว่าการไม่เติม dextrose โดยที่การเติมdextrose ครั้งละ 1 กิโลกรัม จำนวน 5 ครั้งหลังปลูกเชื้อชั่วโมงที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 66.63 x 10^6 CFU/มล.

เอกสารอ้างอิง

โสธร ประเสริฐผล. 2512, การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์.กสิกร 42 (3) : 589 – 305

อัจฉรา ตันติโชดก.25433 แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยชีววิธี กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 148 – 166

Hubei Academy of Agricultural Sciences 1994. International Training Course on Bt (*Bacillus thuringiensis*) Production and Application Wuhan, People Republic of China. October 25- November 11, 1994. pp. 110

ตารางที่ 1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิต *Bacillus thuringiensis* โดยใช้ ปลาน้ำ น้ำตาล dextrose และ inorganic salt

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัม/ลิตร)				
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5
ปลาน้ำ	10	10	12	12	15
Dextrose	5	10	10	15	20
$MgSo_4$	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
K_2HPO_4	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
KH_2PO_4	1.75	1.75	1.75	1.75	1.75
$CaCl_2$	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
$MnSo_4$	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
$FeSo_4$	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

ตารางที่ 2 การผลิตขยายเชื้อ *Bacillus thuringicnsis* โดยใช้ ปลาน้ำ dextrose และเติมน้ำตาล dextrose หลังจาก ปลูกเชื้อแล้วที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ			
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4
ปลาน้ำ	12	12	12	15
Dextrose	10	10	10	10
$MgSo_4$	1.75	1.75	1.75	1.75
K_2HPO_4	1.75	1.75	1.75	1.75

KH_2PO_4	0.07	0.07	0.07	0.07
$CaCl_2$	0.07	0.07	0.07	0.07
$MnSo_4$	0.05	0.05	0.05	0.05
$FeSo_4$	0.03	0.03	0.03	0.03
	ไม่เติม dextrose	เติม dextrose 2 ครั้ง อัตรา 1 ก.ก./ครั้ง ที่ 5, 7 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ	เติม dextrose 3 ครั้ง อัตรา 1 ก.ก./ครั้ง ที่ 5, 7 และ 9 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ	เติม dextrose 5 ครั้ง อัตรา 1 ก.ก./ครั้ง ที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 ชั่วโมงหลังปลูกเชื้อ

ตารางที่ 3 การผลิตเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในถังหมักเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร โดยใช้ปลาน้ำและ dextrose ที่อัตราต่าง ๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ		ระยะเวลาที่ใช้เพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด (ชั่วโมง)	ระยะเวลาที่ใช้สร้าง สปอร์และสารพิษจนเซลล์แตกตัว (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งของผลผลิต	จำนวนสปอร์ที่ผลิตได้ (X 10^6 CFU/มล.)
สูตร 1	1	24.00	28.00	3.15	24.65
	2	23.00	29.00	3.92	18.14
	3	24.00	29.00	3.16	28.87
	เฉลี่ย	**23.67**	**28.67**	**3.41**	**23.89**
สูตร 2	1	25.00	29.00	3.48	21.74
	2	26.00	30.00	3.20	23.11
	3	25.00	32.00	3.72	26.56
	เฉลี่ย	**25.33**	**30.33**	**3.47**	**23.80**
สูตร 3	1	26.00	28.00	4.14	33.39
	2	24.00	29.00	4.28	28.74
	3	22.00	30.00	4.32	29.50
	เฉลี่ย	**24.00**	**29.00**	**4.25**	**30.54**
สูตร 4	1	26.00	29.00	4.50	39.20
	2	23.00	29.00	4.84	34.16
	3	26.00	32.00	4.68	37.92

	เฉลี่ย	**25.00**	**30.00**	**4.67**	**37.09**
สูตร 5	1	25.00	34.00	4.32	32.37
	2	27.00	32.00	4.05	25.58
	3	28.00	32.00	4.17	37.54
	เฉลี่ย	**26.67**	**32.67**	**4.18**	**31.76**

ตารางที่ 4 การผลิต *Bacillus thuringiensis* ในถังหมักเชื้อขนาดจุ 500 ลิตร โดยใช้ปลาน้ำและ dextrose เปรียบเทียบผลของการเติม dextrose อัตรา 1 กิโลกรัมต่อครั้ง ภายหลังจากการปลูกเชื้อแล้วที่ระยะเวลาต่างๆ กัน

อาหารเลี้ยงเชื้อ		ระยะเวลาที่ใช้เพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุด (ชั่วโมง)	ระยะเวลาที่ใช้สร้าง สปอร์และสารพิษจนเซลล์แตกตัว (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งของผลผลิต	จำนวนสปอร์ที่ผลิตได้ (X 10^6 CFU/มล.)
สูตร 1 ไม่	1	23	28	3.92	33.50
เติม	2	23	29	4.11	42.74
dextrose	3	24	31	4.26	38.42
	เฉลี่ย	**23.33**	**29.33**	**4.10**	**38.22**
สูตร 2	1	24	28	4.32	37.14
เติม	2	23	29	4.51	54.66
dextrose	3	23	29	3.90	42.50
2 ครั้ง	**เฉลี่ย**	**23.33**	**28.67**	**4.24**	**44.76**
สูตร 3	1	23	31	4.16	46.45
เติม	2	25	32	4.88	57.20
dextrose	3	24	30	4.92	56.40
3 ครั้ง	**เฉลี่ย**	**24.00**	**31.00**	**4.65**	**53.35**
สูตร 4	1	27	34	5.11	68.12
เติม	2	27	32	4.90	52.44
dextrose	3	29	33	4.78	79.33
5 ครั้ง	**เฉลี่ย**	**27.66**	**33.00**	**4.93**	**66.63**

ตารางที่ 5 ระบบการผลิต ในถังหมักเชื้อใช้สูตรอาหารปลาน้ำและdextrose อัตรา 12 และ 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ไม่มีการเติม dextrose หลังปลูกเชื้อ

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ		จำนวนระยะใบพัดกวน (รอบ/นาที)	ปริมาณ O_2 ในอาหาร (มก/ลิตร)	ปริมาณอากาศ (ก.ก./ซม^3)	จำนวน dextrose (กิโลกรัม)	ปริมาณ antifoam (มล)	ระดับ pH
	ในถัง	ห้อง						
0	28	33	270	7.03	1	-	200	7.2
5	28	32	270	6.75	1	-	-	7.0
6	28	32	270	6.62	1	-	-	6.9
7	28	30	270	6.50	1	-	-	6.8
8	28	28.5	270	6.32	1	-	-	6.8
9	28	28	270	6.41	1	-	-	6.8
10	28	26	240	6.58	1	-	-	6.9
11	28	26	240	6.74	1	-	-	6.8
12	28	26	240	6.60	0.75	-	-	6.7
13	28	25.5	240	6.94	0.75	-	-	6.8
14	28	24	240	6.90	0.75	-	-	7.0
16	28	25	240	6.83	0.75	-	200	6.9
18	28	25	240	6.67	0.75	-	-	6.7
20	28	25	240	6.70	0.75	-	-	6.8
22	28	26	240	6.75	0.75	-	-	6.6
24	28	28	240	6.88	0.75	-	-	6.5
26	28	30	240	7.04	0.75	-	-	6.7
28	28	32	240	7.20	0.75	-	-	6.8

ตารางที่ 6 ดำเนินการผลิต Bt ในถังหมักเชื้อใช้สูตรอาหารปลาน้ำและ dextrose อัตรา 12และ10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ทำการเติม dextrose ชั่วโมงที่ 5 และ7 หลังปลูกเชื้อ

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ		จำนวนระยะใบพัดกวน (รอบ/นาที)	ปริมาณ O_2 ในอาหาร (มก/ลิตร)	ปริมาณอากาศ (ก.ก./ซม^3)	จำนวน dextrose (กิโลกรัม)	ปริมาณ antifoam (มล)	ระดับ pH
	ในถัง	ห้อง						
0	28	36	270	7.30	0.75	-	200	7.2
5	28	34.5	270	6.69	0.75	1	-	6.8
6	28	25	240	6.97	0.75	-	-	6.8
7	28	25	240	6.90	0.75	1	-	7.0
8	27	24	240	6.34	0.75	-	200	7.0
9	27	24	240	5.97	0.75	-	-	7.0
10	27	24	240	6.35	0.75	-	-	7.1
11	28	24	240	6.70	0.75	-	-	7.0
12	28	23	240	6.87	0.75	-	-	7.1
14	28	22.5	240	6.62	0.75	-	200	7.1
16	28	21	240	6.34	0.75	-	-	7.0
18	28	23	240	7.16	0.75	-	-	6.8
20	28	27	240	7.20	0.75	-	-	6.6
22	28	29	240	7.10	0.75	-	-	6.5
24	28	31	240	7.35	0.75	-	-	6.6
26	28	33	240	7.10	0.75	-	-	6.6
28	28	32	240	7.22	0.75	-	-	6.7
30	28	30	240	7.35	0.75	-	-	6.7
32	28		240	7.50	0.75	-	-	6.7

ตารางที่ 7 ดำเนินการผลิต Bt ในถังหมักเชื้อใช้สูตรอาหารปลาน้ำแลdextrose อัตรา 15 และ 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ทำการเติม dextrose ชั่วโมงที่ 5,7 และ9 หลังลูกเชื้อ

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ		จำนวนระยะใบพัดกวน (รอบ/นาที)	ปริมาณ O_2 ในอาหาร (มก/ลิตร)	ปริมาณอากาศ (ก.ก./ซม^3)	จำนวน dextrose (กิโลกรัม)	ปริมาณ antifoam (มล)	ระดับ pH
	ในถัง	ห้อง						
0	31	36	270	9.5	1	-	200	7.2
5	28	31	270	8.44	1	1	-	7.3
6	28	29	240	8.15	0.75	-	200	7.0
7	28	28	240	7.75	0.75	1	-	6.9
8	28	27	240	7.45	0.75	-	100	6.8
9	28	26	240	6.90	0.75	1	-	6.8
10	28	25	240	6.78	0.75	-	200	6.7
11	28	25	240	6.56	0.75	-	-	6.7
12	28	25	240	6.85	0.75	-	-	6.8
13	28	26	240	5.76	0.75	-	-	6.9
14	28	26	240	6.69	0.75	-	-	7.0
16	28	28	240	6.85	0.75	-	-	7.1
18	28	29	240	6.64	0.75	-	-	7.1
20	28	30	240	6.85	0.75	-	-	7.2
22	28	32	240	7.10	0.75	-	-	7.3
24	28	33	240	7.32	0.75	-	-	7.4
26	28	33	240	7.40	0.75	-	-	7.2
28	28	33	240	7.62	0.75	-	-	7.3
30	28	32	240	7.97	0.75	-	-	7.2
32	28	31	240	7.81	0.75	-	-	7.2

ตารางที่ 8 ดำเนินการผลิต Bt ในถังหมักเชื้อใช้สูตรอาหารปลาน้ำและdextrose อัตรา 15 และ 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ทำการเติม dextrose ชั่วโมงที่5,7,9, 11 และ13 หลังปลูกเชื้อ

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ (ชั่วโมง)	อุณหภูมิ		จำนวนระยะใบพัดกวน (รอบ/นาที)	ปริมาณ O_2 ในอาหาร (มก/ลิตร)	ปริมาณอากาศ (ก.ก./ซม^3)	จำนวน dextrose (กิโลกรัม)	ปริมาณ antifoam (มล)	ระดับ pH
	ในถัง	ห้อง						
0	28	27	270	7.03	1	-	200	7.2
5	28	30	270	7.33	1	1	-	7.3
6	28	30	240	8.33	1	-	-	7.4
7	28	29	240	8.37	1	1	-	7.2
8	28	28	240	7.67	1	-	-	6.9
9	29	27	240	7.43	1	1	200	6.8
10	29	25	240	7.51	0.75	-	-	7.0
11	29	24	240	7.63	0.75	1	100	6.9
12	28	23	240	7.10	0.75	-	-	6.8
13	28	22	240	7.34	0.75	1	200	6.7
16	28	20	240	7.33	0.75	-	-	6.8
18	28	20	240	7.10	0.75	-	-	6.6
20	29	20	240	7.57	0.75	-		6.7
22	29	21	240	8.05	0.75	-		6.8
24	29	22	240	8.14	0.75	-		6.9
26	28	23	240	7.95	0.75	-		6.6
28	28	25	240	8.32	0.75	-		6.7
30	28	26	240	8.50	0.75	-		6.9
32	28	26	240	8.11	0.75	-		7.1
34	28	28	240	8.26	0.75			7.2
36								

ทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

Susceptibility of Oriental Fruit Fly , *Bactrocera dorsalis* (Hendel) to the Entomopathogenic Nematodes

วัชรี สมสุข
กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 3 ชนิด คือ *Steinernema carpocapsae* *S. riobrave* และ *S. siamkayai* ประกอบด้วย 3 การทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่เดือนมกราคม2543 – เดือนกันยายน 2546

<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาผลของอัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอย 3 ชนิด ต่อการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ วางแผนการทดลองแบบ Factorial in C R D (3x4) 3 ซ้ำ 2 ปัจจัย ปัจจัย A ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 3 ชนิด ปัจจัย B คือ อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย 4 ระดับ คือ 200 400 800 และ 1600 ตัว/มล./พ.ท. 38 ตร.ซ.ม. พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยขึ้นเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันผลไม้จะสูงตามขึ้นในไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด และอัตราที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้คือ ที่ 800 ตัว/มล.พ.ท. 38 ตร.ซ.ม.

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ของไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด วางแผนการทดลองแบบ Factorial in C R D (3x3) 3 ซ้ำ 2 ปัจจัย ปัจจัย A ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 3 ชนิด ปัจจัย B ที่อุณหภูมิ 3 ระดับคือ 25 30 และ 35^{O}ซ พบว่าไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ที่อุณหภูมิ 25 และ 30^{O}ซ พบการตาย 86.7 และ 84.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าทำลายที่อุณหภูมิ 30 และ 35^{O}ซ พบการตาย 84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* มีประสิทธิภาพต่ำที่ 25 30 และ 35^{O}ซ พบการตาย 26.7 35.6 และ 22.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 43 06003 001

<u>การทดลองที่ 3</u> ศึกษาระยะต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย 3 ชนิด วางแผนการทดลองแบบFactorial in C R D (3x3) 3 ซ้ำ 2 ปัจจัย ปัจจัย A ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 3 ชนิด ปัจจัย B แมลงวันผลไม้ 3 ระยะ คือ หนอนวัย 3 (อายุ 5 วัน) ระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) อายุ 9 วัน และระยะดักแด้อายุ 11 วัน พบว่า ไส้เดือนฝอย ทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้วัย 3 ได้ดีที่สุดคือ 86.7 75.8 และ 22.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงไปเป็นระยะก่อนเข้าดักแด้ คือ 80 62.2 และ 8.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสุดท้ายเป็นระยะดักแด้ คือ2.2 6.7 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คำนำ

แมลงวันผลไม้ เป็นศัตรูสำคัญและรุนแรงเข้าทำลายผลไม้เกือบทุกชนิดในเขตร้อน ทำให้ผลผลิต และคุณภาพลดลง โดยเฉพาะประเทศไทยมีการส่งออกผลไม้หลายชนิด ฉะนั้นแมลงวันผลไม้จึงเป็นปัญหาเร่งด่วนที่ต้องช่วยกันศึกษา และหาแนวทางต่างๆ ในการแก้ไขปัญหาให้สอดคล้องกับนโยบาย G A P ของกรมวิชาการเกษตร โดยทำการเกษตรแบบถูกสุขลักษณะ หลีกเลี่ยงการทำลายสิ่งแวดล้อม ลดการใช้สารเคมี ซึ่งอาจมีพิษตกค้างในผลผลิตเกษตร วิธีการหนึ่งที่มีส่วนช่วยลดประชากรแมลงวันผลไม้ โดยไม่ใช้สารเคมี และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมนั้น คือ การใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงวันผลไม้เป็นตัวควบคุม

ศัตรูธรรมชาติชนิดหนึ่งที่สามารถเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ได้คือ ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* Poinar and Hislop (1981) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่าไส้เดือนฝอย *Neoaplectana carpocapsae* และ *Heterorhabditis hiliothidis* สามารถเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ (medfly) ตัวเต็มวัยได้ หลังจากปล่อยไส้เดือนฝอยในจานแก้ว (petridishes) ที่มีแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยที่เป็นหมันเป็นเวลา 3 วัน ในธรรมชาติแมลงวันผลไม้ระยะตัวหนอนวัย 3 ดีดตัวออกจากผลไม้ที่เป็นพืชอาหารเพื่อเตรียมเข้าดักแด้ในดินบริเวณรอบๆ แหล่งพืชอาหารนั้นเป็นพฤติกรรมที่เอื้ออำนวยให้มีโอกาสที่จะได้สัมผัสหรือพบปะกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในดิน โดยที่หนอนแมลงวันผลไม้จะไชลงไปในดินลึกประมาณ 2-3 ซ.ม. แล้วจึงเริ่มเข้าดักแด้ภายในเวลา 2-12 ชั่วโมง แล้วจะเป็นระยะดักแด้อยู่ประมาณ 10 วัน จึงเริ่มออกจากดักแด้ตัวเต็มวัยโดยขึ้นจากดินที่บริเวณแหล่งปลูกพืชอาหารของแมลงวันผลไม้ หลังจากปรับตัวแข็งแรงดีแล้วจึงมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นภายในเวลาประมาณอีก 7 วันต่อมา ด้วยเหตุนี้ Lindegren and Patrick (1986) จึงได้ทำการทดลองแมลงวันผลไม้ชนิดต่างๆ ในระยะตัวอ่อนวัย 3 ที่ดีดตัวออกจากอาหารเพื่อเข้าดักแด้ โดยใช้อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย *Steinernema feltiae* ตั้งแต่ 5,000 – 500,000 ตัว/ถ้วย พบเปอร์เซ็นต์การตายตั้งแต่ 9–92 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Mediteranean fruit fly 9-85 เปอร์เซ็นต์ Oriental fruit fly และ 0-86 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Melon fly ส่วนในประเทศไทย สุภาภรณ์ (2542) รายงานการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* กับแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera dorsalis*) ในจานทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการ พบว่า เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไส้เดือนฝอยเข้าสู่ตัวหนอนของแมลงวันผลไม้ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยอยู่ร่วมกับหนอนแมลงวันผลไม้ และระดับอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยที่ทำให้หนอนแมลงวันผลไม้ที่ทดสอบตายร้อยละ 50 (LC_{50}) อยู่ระหว่าง 180-231 ตัว และยังพบว่า ไส้เดือนฝอยอัตรา 100-500 ตัว ทำให้ดักแด้ของแมลงวันผลไม้ที่มีอายุ 9 วัน ตาย 66-88 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง รวมทั้งยังสามารถเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยตาย 52-100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3-7 วัน เมื่อผสมไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมเลี้ยงตัวเต็มวัย ด้วยข้อมูลต่างๆ เหล่านี้ กลุ่มกีฏและสัตววิทยาจึงสนใจในการที่จะพัฒนาการนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ซึ่งขณะนี้สามารถพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเป็นปริมาณมาก (วัชรีและสุทธิชัย, 2544) และได้ถ่ายทอดการผลิตสู่ภาคเอกชนเพื่อผลิตเป็นการค้าแล้ว นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอยชนิด

ใหม่ๆ ในเขตภูมิอากาศแถบร้อน ได้แก่ *S. riobrave* Cabanillas, Poinar and Raulston ค้นพบที่มลรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา (Cabanillas *et al.*, 1994) และ *S. siamkayai* Stock, Somsook and Reid ค้นพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี2539 ที่ อ.หล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ (วัชรี, 2544) ซึ่งได้ถูกจำแนกเป็นชนิดใหม่ (new sp.) (Stock *et al.*, 1998) ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 35°ซ ฉะนั้นจึงควรได้มีการศึกษาถึงศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้เปรียบเทียบกับที่ผลิตเป็นการค้า คือ ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เพื่อจะได้เป็นข้อมูลในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในภาคสนามต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ดำเนินการทดลอง ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา มกราคม 2543 ถึง กันยายน 2546

การทดลองประกอบด้วย3 การทดลองย่อย ดังนี้

1. ศึกษาผลของอัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอยB ชนิด ต่อการเข้าทำลายของหนอนแมลงวันผลไม้

วางแผนการทดลอง แบบFactorial in C R D (3x4) 3 ซ้ำ ประกอบด้วย2 ปัจจัย ปัจจัย A ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 3 ชนิด คือ *Steinernema carpocapsae S. riobrave* and *S. siamkayai* ปัจจัย B คือ อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย4 ระดับ ได้แก่ 200 400 800 และ 1600 ตัว/มล.

วิธีดำเนินการทดลอง

- เตรียมไส้เดือนฝอย*S. carpocapsae* ที่ผลิตด้วยอาหารเหลว(วัชรีและสุทธิชัย, 2541) ส่วนไส้เดือนฝอย*S. riobrave* and *S. siamkayai* เลี้ยงด้วยแมลงอาศัย(หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*) แล้วจัดระดับความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย4 ระดับ ดังกล่าวข้างต้น โดยนับด้วยวิธี dilution counting ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
- นำทรายละเอียดที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ150 °ซ นาน 2 ชั่วโมง ใส่ในถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง6 ซม. สูง 5 ซม. (พ.ท.≈38 ตร.ซ.ม.) ถ้วยละ 60 กรัม พร้อมฝาปิด
- เติมน้ำกลั่นถ้วยละ 2 มล. แล้วคนให้ความชื้นสม่ำเสมอทั่วถ้วย
- ปล่อยไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด ที่ระดับความหนาแน่น ทั้ง 4 ระดับ ในแต่ละถ้วยดังกล่าวข้างต้น โดยทำวิธีการละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 ถ้วย
- ปล่อยหนอนแมลงวันผลไม้วัย3 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ถ้วยละ5 ตัว
- นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 72 ชั่วโมง จึงทำการตรวจนับการตายของหนอนแมลงวันผลไม้ด้วยไส้เดือนฝอย ในทุกวิธีการ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ของไส้เดือนฝอย

วางแผนการทดลอง แบบ Factorial in C R D (3x3) 3 ซ้ำ ประกอบด้วย 2 ปัจจัย คือ ปัจจัย A ไส้เดือนฝอย 3 ชนิด คือ *S. carpocapsae S. riobrave* และ *S. siamkayai* ปัจจัย B ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 25 30 และ 35^{O}ซ

วิธีดำเนินการทดลอง

- เตรียมภาชนะการทดลอง คือ ทรายละเอียดใส่ถ้วย เช่นเดียวกับการทดลองที่
- เตรียมไส้เดือนฝอย 3 ชนิด เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แล้วจัดระดับความหนาแน่นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด จากผลการทดลองที่ 1 (800 ตัว/มล.) ใส่ลงในถ้วยๆ ละ 1 มล. ของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดปล่อยหนอนแมลงวันผลไม้วัย3 ลงถ้วยละ 5 ตัว
- จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 3 ระดับ ดังกล่าวข้างต้น เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง โดยทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำๆ ละ 3 ถ้วย
- ตรวจการตายของแมลงวันผลไม้ เนื่องจากไส้เดือนฝอยในทุกวิธีการภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้วัยต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบFactorial in C R D (3x3) 3 ซ้ำ 2 ปัจจัย ปัจจัย A ไส้เดือนฝอย 3 ชนิด คือ *S. carpocapsae S. riobrave* และ *S. siamkayai* ปัจจัย B แมลงวันผลไม้ระยะต่างๆ คือ ระยะหนอนวัย 3 อายุ 5 วัน ระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้(prepupa) อายุ 9 วัน และระยะดักแด้อายุ 11 วัน

วิธีดำเนินการทดลอง

- เตรียมภาชนะการทดลอง และไส้เดือนฝอย3 ชนิด เช่นเดียวกับการทดลองที่2
- จากนั้นปล่อยแมลงวันผลไม้ระยะต่างๆ 3 ระยะดังกล่าวข้างต้น ถ้วยละ 5 ตัว ในแต่ละกรรมวิธีๆ ละ 3 ซ้ำ
- นำเก็บที่อุณหภูมิ 25^{O}ซ เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง
- ตรวจการตายของแมลงวันผลไม้ เนื่องจากไส้เดือนฝอย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การบันทึกข้อมูล

บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงวันผลไม้ เนื่องจากไส้เดือนฝอยในทุกวิธีการในแต่ละการทดลอง

ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 ศึกษาอัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอย 3 ชนิด ในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ จาก Table 1 จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันผลไม้ ไม่มีความแตกต่างกันสถิติ ในการใช้ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดที่อัตรา 200 และ 400 ตัว/มล. แต่หากเปรียบเทียบระหว่างไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับอัตราเดียวกันนี้เปอร์เซ็นต์การตายเนื่องจากไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (40-53%) และ *S. riobrave* (38-42%) มีค่าใกล้เคียงกัน แต่สูงกว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันผลไม้อันเนื่องจากไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* (20-22%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเพิ่มอัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอยเป็น 800 และ 1600 ตัว/มล. เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันผลไม้ก็เพิ่มขึ้นสูงกว่าที่อัตราการใช้ 200 และ 400 ตัว/มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (82-87%) และ *S. riobrave* (71-80%) ส่วนไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* การใช้ที่อัตรา 1600 ตัว/มล. จึงจะเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันผลไม้สูงกว่าที่ระดับ200 และ 400 ตัว/มล. และเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย 800 และ 1600 ตัว/มล. นั้นไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (82-87%) และ *S. riobrave* (71-80%) มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูงกว่าประสิทธิภาพของ *S. siamkayai* (33-40%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย ในหนอนแมลงวันผลไม้วัย 3 จาก Table 2 จะเห็นว่าประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่ 25 และ 30^{O}ซ อยู่ในระดับสูง 86 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและสูงกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 35^{O}ซ (8.9%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน *S. riobrave* การเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 30^{O}ซ (84.5%) และที่ 35^{O}ซ (84.5%) มีแนวโน้มสูงกว่าที่ 25^{O}ซ (75.6%) แม้ว่าจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* ที่ 30^{O}ซ มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้สูงสุด (35.6%) และสูงกว่าที่ 35^{O}ซ (22%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกับที่ 25^{O}ซ (26.7%) และถ้าเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด ในทุกระดับอุณหภูมิ การเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ของ *S. siamkayai* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า *S. carpocapsae* และ *S. riobrave* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 25^{O}ซ ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สามารถเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ได้สูงกว่า *S. riobrave* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ 35^{O}ซ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* กลับมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายได้สูงกว่า *S. carpocapsae* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ในระยะต่างๆ จาก Table 3 พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สามารถเข้าทำลายระยะหนอนวัย 3 ระยะก่อนเข้าดักแด้ (prepupa) ได้สูงถึง 86.7 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากเปอร์เซ็นต์การตายในระยะดักแด้ของแมลงวันผลไม้ (2.2%) เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเข้าทำลาย แมลงวันผลไม้ระยะหนอนวัย 3 ได้ 77.8 เปอร์เซ็นต์ สูงและแตกต่างจากระยะ

ก่อนเข้าดักแด้ (62.2%) และระยะดักแด้ (6.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* เข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้วัย3 ได้เพียง 22.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนวัยก่อนเข้าดักแด้ (8.9%) และระยะดักแด้ (0%) และเมื่อเปรียบเทียบ ประสิทธิภาพระหว่างไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด ในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ ทั้ง 3 ระยะ จะเห็นว่า ไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* มีประสิทธิภาพต่ำกว่าไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* และ *S. riobrave* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* จะมีแนวโน้มว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่า*S. riobrave* ถึงแม้จะไม่เห็นความแตกต่างในระยะหนอนวัย 3 แต่ในระยะก่อนเข้าดักแด้จะเห็นความแตกต่างทางสถิติชัดเจน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ของไส้เดือนฝอย 3 ชนิด คือ *S. carpocapsae* *S. riobrave* และ *S. siamkayai* **ปัจจัยที่หนึ่ง** ได้แก่ อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยที่ใช้ พบว่า ยิ่งเพิ่มความเข้มข้นสูงขึ้นในไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดจะพบเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนแมลงวันผลไม้เพิ่มสูงขึ้น โดยในการทดลองครั้งนี้ใช้อัตรา 200 400 800 และ 1600 ตัว/มล. จะเห็นว่าที่อัตรา 1600 ตัว/มล. มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด (86%) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากที่อัตรา 800 ตัว/มล. ฉะนั้นอัตราที่เหมาะสมที่จะใช้ควบคุมแมลงวันผลไม้น่าจะอยู่ที่ 800 ตัว/มล./พ.ท. 38 ตร.ซ.ม. **ปัจจัยที่สอง** ระดับอุณหภูมิต่างๆ มีผลต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ทั้ง3 ชนิด ในการเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ พบว่าที่ระดับอุณหภูมิ 25 และ 30^{O}ซ ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* มีประสิทธิภาพสูงเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ได้ 86.7 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 35^{O}ซ ประสิทธิภาพจะลดลงเหลือเพียง 8.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตรงข้ามกับ*S. riobrave* ที่อุณหภูมิ 30 และ 35^{O}ซ มีประสิทธิภาพสูงในการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ 84.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำลงถึง 25^{O}ซ ประสิทธิภาพจะลดลงเหลือ 75.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไส้เดือนฝอย*S. siamkayai* มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้ได้สูงสุดเพียง 35.6 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30^{O}ซ และถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 35^{O}ซ หรือลดลงถึง 25^{O}ซ ประสิทธิภาพจะลดลงเหลือ 22.2 และ 26.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้น ไส้เดือนฝอยตัวที่เหมาะสมจะนำไปใช้ทดสอบควบคุมแมลงวันผลไม้ ในสภาพไร่ต่อไปน่าจะเป็น *S. riobrave* ซึ่งแสดงศักยภาพสูงระหว่าง 75-84 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 ระดับอุณหภูมิ 25-35^{O}ซ **ปัจจัยที่ 3** ระยะต่างๆ ของแมลงวันผลไม้ มีผลต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด พบว่าไส้เดือนฝอยทุกชนิดมีประสิธิภาพในการเข้าทำลายหนอนแมลงวันผลไม้วัย 3 ได้ดีที่สุด รองลงไปเป็นระยะก่อนเข้าดักแด้ และสุดท้ายระยะดักแด้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะดักแด้เป็นระยะพักตัว อวัยวะส่วนต่างๆ ของแมลงเช่น ปาก ทวาร รูหายใจปิดหมด ทำให้โอกาสการเข้าไปในตัวแมลงของไส้เดือนฝอยลดน้อยลงด้วย ฉะนั้นในสภาพธรราชาติจริงๆ ไส้เดือนฝอยที่มีอยู่บนดินจะมีโอกาสเข้าทำลายแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัย 3 ที่ดีดตัวลงเข้าดักแด้ในดิน จึงเป็นไปได้สูง ถ้ามีการพ่น

ไส้เดือนฝอยรอบๆ โคนต้นผลไม้ให้ทั่วถึงเพียงพอไว้ก่อนจะเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดปริมาณประชากรแมลงวันผลไม้ในฤดูต่อไปได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณมนตรี จิรสุรัตน์ และคุณอัมพร วิโนทัย ที่อนุเคราะห์แมลงวันผลไม้ มาใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณ นายเฉลิมศักดิ์ ผมพันธ์ นักวิชาการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ ที่ช่วยงานทดลองจนได้ผลสำเร็จออกมาด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

วัชรี สมสุข. 2544. เทคนิคในการค้นหาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในธรรมชาติ . ว. กีฏ. สัตว.23(3) : 205-207.

วัชรี สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2544. ผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า ในรายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ จัดพิมพ์โดยกรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์172 หน้า.

สุภาภรณ์ เสียงศรี. 2542. การศึกษาการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (Hendel) วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น 67 หน้า.

Cabanillas, H.E., G.O. Poinar and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. Fundam. Appl. Nematol. 17(2) : 123-131.

Lindegren, J.E. and Patrick V. Vail. 1986. Susceptibility of Mediteranean fruit fly, Melon fly andOriental fruit fly (Diptera : Tephrifidae) to the entomogenous nematode *Steinernema feltiae* in laboratory tests. Environ. Entomol. 15 : 465 – 468.

Poinar, G.O., Jr. and R.G. Hislop. 1981. Mortality of Mediteranean fruit fly adults *(Ceratitis capitata)* from parasitic nematodes (*Neoaplectana* and *Heterorhabditis* spp.) IRCB Med. Sci. Microbiol. Patasitol. Infect. Dis. 9 : 641.

Stock, S.P., V. Somsook and A.P. Reid. 1998. *Steineernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) entomopathogenic nematodes from Thailand. Systematic Parasitology 41 : 105-113.

Table 1 Average percentage mortality of fruit fruit fly larvae by three species of entomopathogenic nematode at different densities of nematode per millitre.

Nematode concentration (nema/ml) (A)	Species of nematode (B)			A-Mean
	S. carpocapsae	***S. riobrave***	***S. siamkayai***	
200	39.99 b[1/] (a)[2/]	37.77 b (a)	20.00 b (b)	32.59
400	53.33 b (a)	42.22 b (a)	22.22 b (b)	39.26
800	82.22 a (a)	71.11 a (a)	33.33 ab (b)	62.22
1600	86.66 a (a)	80.00 a (a)	40.00 a (b)	68.88
B-Mean	**65.55**	**57.77**	**25.88**	**50.74**

CV = 16.8%

[1/] In a column, means followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

[2/] In a row, means followed by a common letter in a bracket ( ) are not significantly different at 5% by DMRT.

Table 2 Average percentage mortality of fruit fly larvae by three species of entomopathogenic nematode (800 nema/ml) at different temperatures.

Temperature (A)	Entomopathogenic nematode species (B)			A-Mean
	S. carpocapsae	***S. riobrave***	***S. siamkayai***	
25°C	86.67 b[1/] (a)[2/]	75.56 a (b)	26.67 ab (c)	62.97
30°C	84.45 a (a)	84.45 a (a)	35.56 a (b)	68.15
35°C	8.89 b (b)	84.45 a (a)	22.22 b (b)	38.52
B-Mean	**60.00**	**81.48**	**28.15**	**56.545**

CV = 9.9%

[1/] In a column, means followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

[2/] In a row, means followed by a common letter in a bracket ( ) are not significantly different at 5% by DMRT.

Table 3 Average percentage mortality of different stages of fruit fly larvae by three species of entomopathogenic nematode (800 nema/ml) at 25°C.

Stage of fruit fly (A)	Species of nematode (B)			A-Mean
	S. carpocapsae	***S. riobrave***	***S. siamkayai***	
3nd larva	86.67 a[1/] (a)[2/]	75.78 a (a)	22.22 a (b)	62.22
prepupa	80.00 a (a)	62.22 b (b)	8.89 b (c)	50.37
pupa	2.22 b (a)	6.67 c (a)	0 b (a)	2.96
B-Mean	**56.29**	**48.89**	**10.37**	**38.52**

CV = 14.9%

[1/] In a column, means followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

[2/] In a row, means followed by a common letter in a bracket ( ) are not significantly different at 5% by DMRT.

ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อปลาและกระต่าย

Effect of Sporocysts of *Sarcocystis singaporensis* on fish and Rabbit

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อปลาและกระต่าย ได้ปฏิบัติการทดลองในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ในปีพ.ศ. 2546 โดยการให้เชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ในอัตรา 8×10^5 ต่อตู้ ในตู้ปลานิลตู้ละ 7 ตัว ตู้ จำนวน 6 ตู้ และให้น้ำกลั่นเป็นตู้เปรียบเทียบจำนวน 1 ตู้ ส่วนปลาดุกทำการเช่นเดียวกันกับปลานิล แต่มีปลา 4 ตัว ต่อตู้ สำหรับกระต่ายทำการทดลองกับกระต่ายที่มีอายุ 2 เดือน จำนวน 4 คู่ /กรง และกรงสุดท้ายเป็นกรงเปรียบเทียบ โดยให้เชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ โดยตรงทางปาก ในอัตรา 2×10^5 ซีสต์ / ตัว

ผลการศึกษาพบว่า อัตราการตายของปลาของกลุ่มปลานิลที่ได้รับเชื้อโปรโตซัว และกลุ่มเปรียบเทียบไม่แตกต่างกันทางสถิติ และลักษณะของปลาตายมีความคล้ายคลึงกัน สำหรับปลานิลกลุ่มที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวไม่พบอาการผิดปกตใด ๆ และไม่พบซีสต์ในกล้ามเนื้อปลา เช่นเดียวกันกับในปลาดุกอัตราการตายของปลาไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับกระต่ายเลี้ยงก็เช่นเดียวกัน ไม่พบอาการผิดปกติ รวมทั้งซีสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ในกล้ามเนื้อลำตัว นอกจากนี้ยังพบว่าการขยายพันธุ์ของกลุ่มติดเชื้อเป็นปกติเช่นกัน

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ ไม่สามารถเจริญและพัฒนาในปลาและกระต่ายได้ จึงไม่ทำให้ปลานิล ปลาดุก และกระต่ายติดเชื้อ และแสดงอาการป่วยได้

คำนำ

Sarcocystis singaporensis เป็นปรสิตโปรโตซัว ที่เจริญเติบโตได้ดีในหนูสกุล *Rattus* และ *Bandicota* และงูเหลือม (*Python reticulatus*) ซึ่งวงจรชีวิตของปรสิตชนิดนี้มีความเฉพาะเจาะจงต่อสัตว์อาศัยมากและระบาดแพร่หลายทั้งในหนูบ้าน และหนูศัตรูพืชในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Haefner,1987 ; Jaekel et al.,1997 ; Zamen,1976) Jaekel (1996) ซึ่งได้ทำการวิจัยศักยภาพของโปรโตซัวชนิดนี้ในการกำจัดหนู รายงานว่า ความเข้มข้นของสารแขวนลอย สปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ $2x10^4$ สามารถทำให้หนูนอรเวและหนูท้องขาวบ้าน(*Rattus rattus frugivorous*) ในห้องปฏิบัติการป่วยและตายได้ และผลจากการ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 46 06012 004 ใส่ในอาหารแมวขนาด 1 กรัม พบว่า สามารถทำให้ประชากรหนูท้องขาวบ้านในโรงเรือนร้างแห่งหนึ่งในประเทศอียิปต์ลดลง 73% และโปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถพัฒนาและเจริญเติบโตในสัตว์อื่นใด (non target species) เช่น หนูฟานเหลือง ไก่ หมา ลิง กระต่าย กบและคางคก เป็นต้น ในประเทศไทยยุวลักษณ์และคณะ (2539,2540) รายงานว่าประมาณ 29.52% ของซาร์โคซิสต์ (sarcocysts) ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูที่ตรวจพบเป็น *Sarcocystis singaporensis* ส่วนสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* นั้นพบในมูลงูเหลือมที่กินหนูติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้และจับได้จากสถานที่ต่าง ๆ ทั้งจากกรุงเทพมหานครและเขตปริมณฑล รวมทั้งจากสวนปาล์มน้ำมันทางภาคใต้ และได้ทำการขยายพันธุ์โปรโตซัวชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร เพื่อนำมาใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวกับ *Sarcocystis singaporensis* ในประเทศไทย ผลจากการวิจัยในห้องปฏิบัติการแสดงให้เห็นว่า การให้สารละลายที่มีสปอร์โรซีสต์แขวนลอยอยู่ตั้งแต่ 100,000 ซีสต์เป็นต้นไปโดยตรงทางปาก ทำให้หนูทดลองในสกุล *Bandicota* และสกุล *Rattus* ป่วยและตายทั้งหมด (100%) ภายหลังได้รับเชื้อแล้ว 10-16 วัน และยังพบว่าเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ในหนูหริ่ง (*Mus* sp.) จึงไม่ทำให้หนูหริ่งป่วยเป็นโรค Sarcocystosis แต่ประการใด สำหรับการศึกษาครั้งมีวัตถุประสงค์ เพื่อยืนยันผลของโปรโตซัวชนิดนี้ต่อปลาและกระต่ายเพิ่มเติม โดยเฉพาะระยะสปอร์โรซีสต์ ซึ่งเป็นระยะที่ใช้สารเป็นสารชีวินทรียกำจัดหนู

การดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. ปลานิล ขนาด 2 เซนติเมตร จำนวน 100 ตัว ปลาดุกขนาด 1 นิ้ว จำนวน 100 ตัว
2. กระต่ายเลี้ยงที่มีอายุ ตั้ง แต่ 1-1.5 เดือน จำนวน 5 คู่ น้ำผ่านเครื่องกรองน้ำแบบธรรมดา
3. ตู้เลี้ยงปลาใหญ่ (36 x 80 x 36 เซนติเมตร) จำนวน 6 ตู้ และขนาด 26 x 41 x 26 เซนติเมตร จำนวน 15 ตู้
4. กรงเลี้ยงกระต่ายขนาด 1 x 0.7 x 1 เมตร จำนวน 5 กรง พร้อมที่ใส่อาหารและขวดน้ำ
5. สารแขวนลอยโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์จำนวน 50 มิลลิลิตร
6. อาหารปลานิลและปลาดุก อาหารกระต่าย หญ้าขน แครอท
7. น้ำยาปรับสภาพน้ำสำหรับตู้เลี้ยงปลา pH meter ปั๊มให้ออกซิเจนที่มีทางออก 3 และ 4 หัว จำนวน 8 ตัว
8. ไปเป็ตขนาด 10-100 ไมโครลิตร พร้อมทิป บีเกอร์ กระบอกตวงขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

การศึกษาผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อปลานิลและปลาดุก

นำปลาทดลองทั้ง 2 ชนิด มาเลี้ยงในตู้ปลาขนาดใหญ่ 6 ตู้ละ 25-50 ตัว(ปลานิล 50 ตัว/ตู้ ปลาดุก 25 ตัว/ตู้) ที่มีน้ำในปริมาณเหมาะสม (ปลา 1 ตัวต่อน้ำ 1 ลิตร) และได้มีการปรับสภาพน้ำแล้ว มี pH ของน้ำเท่ากับ 7.2 และมีอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 23 - 24 °C ให้มีออกซิเจนในน้ำแต่ละตู้ประมาณ 80% เป็นเวลา 12 วัน ให้อาหาร 3 ครั้ง/อาทิตย์ ในปริมาณที่พอดีกับจำนวนปลา ตรวจการตายของปลาแต่ละชนิด ถ้าตายมากกว่า 10% ถือว่าปลาไม่แข็งแรงและปรับสภาพตัวไม่ได้ หรือสภาพน้ำไม่เหมาะสม แต่ถ้าปลาตายประมาณ 5% ให้เลี้ยงต่ออีก 7 วัน แล้วนำมาใช้ทดลองได้ โดยแบ่งปลานิล ใส่ลงในตู้เลี้ยงปลาขนาดเล็กตู้ละ 7 ตัว จำนวน 7 ตู้ ส่วนปลาดุกใส่ลงในตู้ขนาดเดียวกันแต่ใช้ปลาทดลองเพียง 4 ตัว/ตู้ จำนวน 7 ตู้เช่นกัน ก่อนการทดลองงดให้อาหารปลา 24 ชั่วโมง ไปเป็ตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวที่เตรียมไว้ ในอัตรา 65 µl ซึ่งมีสปอร์โรซีสต์ 8×10^5 ซีสต์ ต่อตู้ปลา 1 ตู้ ชนิดละ 6 ตู้ โดยแบ่งหยอดใส่ 4 ตำแหน่ง สำหรับตู้ปลาตู้ที่ 7 ของปลาแต่ละชนิด ใช้เป็นตู้ปลาเปรียบเทียบ โดยใช้น้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากันหยอดลงในตู้แบบเดียวกัน หลังจากหยอดสปอร์โรซีสต์แล้ว 3 ชั่วโมง จึงให้อาหารปลาตามปกติทุกตู้ ในช่วงการทดลอง 4 วันแรก ไม่มีการเปลี่ยนน้ำ หลังจากนั้นจึงทำการเปลี่ยนน้ำที่ปรับสภาพที่เหมาะสมแล้วทุก 3 วัน ทำการบันทึกลักษณะการว่ายน้ำของปลา การหายใจของปลา และพฤติกรรมการกินอาหารของปลาทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน

การวิเคราะห์ผลใช้ Mann-Whitney Rank Sum Test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

การศึกษาผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อกระต่ายเลี้ยง

นำกระต่ายที่มีอายุเท่ากัน จับคู่ และแบ่งเลี้ยงในกรงเดียวกัน ที่มีตาข่ายกั้นแบ่งครึ่งห้องไว้ ให้อาหารและน้ำ จนกระต่ายมีอายุครบ 2 เดือน จึงนำใช้ทดลอง ในระหว่างการทดลองถ้ากระต่ายที่มีอาการท้องเสีย หรือ

มีไรตามใบหู ทำการรักษาตามคำแนะนำของสัตวแพทย์โรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อกระต่ายแต่ละคู่มีอายุครบ 2 เดือน และก่อนการทดลองให้อดอาหาร 24 ชั่วโมง หลังจากให้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* โดยใช้ feeding tube ในอัตรา lethal dose คือ 2×10^5 ซีสต์ (37 µl) / กระต่าย 1 ตัว จำนวน 4 คู่ สำหรับกระต่ายอีก 1 คู่ ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ โดยให้วิธีเดียวกันแต่เป็นน้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากัน ให้น้ำและอาหารตามปกติรวมทั้งอาหารเสริม หลังจากเลี้ยงกระต่ายทดลองจนครบ 2.5 เดือน เอาตาข่ายที่กั้นแบ่งครึ่งออก ปล่อยให้กระต่ายจับคู่ เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ของกระต่ายที่ติดเชื้อโปรโตซัว บันทึกอาการป่วยของกระต่าย จำนวนกระต่ายที่ป่วยและตาย ปริมาณซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในกล้ามเนื้อลำตัว พฤติกรรมการกินอาหาร การขยายพันธุ์ ระยะเวลาตั้งท้อง จำนวนลูกต่อครอก เป็นต้น

ผลการศึกษาและวิจารณ์

<u>การศึกษาผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อปลานิลและปลาดุก</u>

ปลานิลและปลาดุกที่เลี้ยงไว้ในตู้เลี้ยงขนาดใหญ่ พบอัตราการตาย ประมาณ 5 % น้ำที่ใช้เลี้ยงปลาทดลองเป็นน้ำกรองจากเครื่องกรองน้ำตามบ้านและสามารถดื่มได้ pH ของน้ำในตู้ปลาเท่ากับ 7.2 ส่วนอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 23 - 24 °C และการทดลองเริ่มเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือน มีนาคม 2546

ตลอดเวลาระยะเริ่มแรกของการทดลอง 4 วัน ปลานิลทุกตัว ครีบทั้งหมดแผ่บาน เมื่อว่ายน้ำ ลักษณะท่าทางของปลาขณะว่ายน้ำเป็นปกติ และไม่รีบเร่ง การหายใจปกติ มีการกินอาหารตามปกติ หลายตัวเข้าตอดกินทันทีที่หยอดใส่ ไม่พบปลานิลตายทั้งในตู้ปลาทดลองและเปรียบเทียบ แต่ภายหลังการทดลองแล้ว 15-20 วัน จึงพบปลานิลตาย 3-4 ตัว (ในตู้ทดลองปลานิลตาย 1 ตัว/ตู้ จำนวน 4 ตู้ ในตู้ปลาเปรียบเทียบ 3 ตัว) ซึ่งอัตราการตายของปลานิลนี้ไม่แตกกันทางสถิติ (P=0.710) ลักษณะการตายของปลาทั้งตู้ปลาทดลองและเปรียบเทียบเหมือนกัน คือ เหงือกปลามีสีซีด ข้างลำตัวมีสีคล้ำ ครีบบางส่วนถูกกัดขาด เมื่อผ่าดูแล้วไม่พบอาการที่บ่งชี้ว่าเกิดจากเชื้อโปรโตซัว ผู้ทำการทดลองสังเกตว่าการตายของปลานิลนั้น มักเกิดกับปลาที่อ่อนแอ และเมื่อมีการเปลี่ยนน้ำใหม่ สำหรับปลาดุกการว่ายน้ำว่องไว และว่ายเข้าตำแหน่งที่มีการหยอดเชื้อ เช่นกัน เช่นเดียวกันกับปลานิล พบปลาดุกทั้งในตู้ทดลองและตู้เปรียบเทียบตาย ภายหลังการทดลองแล้ว 17 วัน (1 ตัวในแต่ละตู้ทดลองจำนวน 3 ตู้ และ 2 ตัว ในตู้เปรียบเทียบ) ซึ่งอัตราการตายของปลาดุกนี้ไม่แตกกันทางสถิติ (P=0.983) สำหรับปลาดุกตายผิวลำตัวมีรอยขูดขีดมาก บางตัวส่วนหนวดขาดวิ่น ซึ่งเข้าใจว่าเกิดจากเงี่ยงปลาของตัวอื่นๆ และการกัดกันของปลา เมื่อมีการเปลี่ยนน้ำใหม่ล่าช้า เหงือกสีซีด ผิวลำตัวมีสีจากน้ำตาลเข้มเป็นสีอ่อน เมื่อผ่าดูไม่พบลักษณะของเนื้อใดๆ ที่จะเกิดจากเชื้อโปรโตซัว

ภายหลังการทดลองแล้ว 1 เดือน จึงทำการผ่าตัดทั้งปลานิลและปลาดุกที่ติดเชื้อโปรโตซัว เพื่อพิสูจน์การสร้างซีสต์ของโปรโตซัวในกล้ามเนื้อปลา ผลการพิสูจน์ ไม่พบซีสต์ใด ๆ ที่เกิดจากการเจริญพัฒนาแบบไม่มีเพศของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในเนื้อปลาแต่อย่างใด (ตารางที่ 1)

การศึกษาผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อกระต่ายเลี้ยง

ทำการเลี้ยงกับกระต่ายเลี้ยง (อายุ 1 เดือน 2 คู่ และอายุ 1.5 เดือน 3 คู่) เป็นคู่ในกรงทดลองที่มีที่กั้น จนกระต่ายมีอายุครบ 2 เดือน (น้ำหนัก ~ 1.3 กิโลกรัม) โดยการให้อาหารกระต่าย และอาหารเสริมสลับกันไป เช่น หญ้าขน แครอท เป็นต้น จึงจะนำมาใช้ในการทดลอง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกันยายน 2546

ผลการทดลอง พบว่า กระต่ายที่อายุ 1 เดือน ป่วยเป็นโรคท้องเสียตาย 3 ตัว(เพศเมีย 2 ตัวและเพศผู้ 1 ตัว) เพศผู้ที่เหลือสามารถรักษาได้ทันจึงปลอดภัย ส่วนกระต่ายที่มีอายุ 1.5 เดือน จึงต้องให้ยาแก้ท้องเสียกันไว้ 3 วัน ดังนั้นการทดลองครั้งนี้ มีกระต่าย 3 คู่ และ 1 เพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง(2 คู่ และ 1 เพศผู้ ให้กินเชื้อโปรโตซัว อีก 1 คู่ กินน้ำกลั่นธรรมดาเป็นชุดเปรียบเทียบ) ภายหลังกระต่ายได้รับสารแขวนลอยสปอร์โร -ซีตส์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* แล้ว ไม่พบอาการป่วยของกระต่ายเนื่องจากเชื้อโปรโตซัวแต่อย่างใด กระต่ายทุกตัวร่าเริง กินอาหารจุ ภายหลังการทดลองแล้ว 2.5 เดือน ทำการผ่าตัดกระเพศผู้ 1 ตัวที่ติดเชื้อโปรโตซัว ส่วนตับ ไต หัวใจและปอดปกติ ส่วนกล้ามเนื้อก็ไม่พบซีสต์ที่เกิดจากการเจริญพัฒนาของโปรโตซัวชนิดนี้แต่อย่างใด สำหรับกระต่ายอีก 3 คู่ นำที่กั้นแบ่งกรงออก เพื่อให้กระต่ายจับคู่กัน กระต่ายเพศเมียของคู่ที่ 1 แล 2 คลอดลูก 6 และ 1 ตัว ตามลำดับ ภายหลังผสมพันธุ์แล้ว 33 วัน ส่วนเพศเมียของคู่เปรียบเทียบคลอดลูก 6 ตัว ภายหลังผสมพันธุ์แล้ว 43 วัน ซึ่งระยะทั้งท้องของกระต่ายปกติอยู่ระหว่าง 35 –40 วัน(Lekakul etal, 1976) นั่นแสดงว่าการขยายพันธุ์ของกระต่ายที่ติดเชื้อโปรโตซัวและกระต่ายชุดเปรียบเทียบเป็นไปอย่างปกติ หลังจากนั้นทำการผ่าตัดกระต่ายที่ติดเชื้อโปรโตซัว 1 คู่ เช่นเดียวกันไม่พบการผิดปกติของอวัยวะสำคัญ เช่น ตับ ไต และปอด และไม่พบซีสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ในกล้ามเนื้อ (ตารางที่ 1)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อปลาและกระต่าย พบว่าเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้ ไม่สามารถเจริญและพัฒนาในปลาและกระต่ายได้ จึงไม่ทำให้ปลานิล ปลาดุก และกระต่ายติดเชื้อ และแสดงอาการป่วยได้

คำขอบคุณ

สำหรับการศึกษาผลของโปรโตซัว *S. singaporensis* ในปลา ได้รับคำแนะนำที่มีประโยชน์ต่อการทดลองครั้งจากคุณวิภา ตั้งนิพนธ์ กลุ่มงานวิจัยผลกระทบจากการใช้วัตถุมีพิษการเกษตร สำนักวิจัยปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ , วิยะดา สีหบุตร และ เสริมศักดิ์ หงส์นาค . 2539ก. ผลของโปรโตซัว, *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่ และหนูนอร์เว . น. 503-515. ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช(ภาคบรรยาย)ครั้งที่ 10, 24-28 มิถุนายน 2539 ณ โรงแรมหัวหินบลูเวฟ บีช รีสอร์ท อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และ T. Jaekel, 2539ข. การแพร่ระบาดของ Sarcocystis ในหนูศัตรูพืชในประเทศไทย น.207-214 ใน เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช(ภาคแผ่นภาพ) ครั้งที่ 10, 24-28 มิถุนายน 2539 ณ โรงแรมหัวหินบลูเวฟ บีช รีสอร์ท อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ, ปราสาททอง พรหมเกิด, กรแก้ว เสือสะอาด, เสริมศักดิ์ หงส์นาค และทรงทัพ แก้วตา.2540ก. ผลของโปรโตซัว, *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2540 กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 10-16.

Jaekel, T., H.Burgstaller, and W.Frank, 1996. *Sarcocystis singaporensis*, Studies on Host specificity, Pathogenicity and potential use as a biocontrol agent of Rats. J.Parasitol., 82 : 280-287.

Haefner, U., and W.Frank,1984. Host Specificity and Host Range of the Genus Sarcocystis in Three specificity, Pathogenicity and potential use as a biocontrol agent of Rats. J.Parasitol., 82 : 280-287.

Wood, B.J. 1985. Biological control of Vertebrates- a Review and Assessment of Prospects for Malaysia. J.Pl. Prot. Tropics 2(2):67-69

Zaman, V. 1976. Host range of *Sarcocystis orientalis*. South. Asian J.Trop.Med.Pub. Hlth., 7 : 112.

ตารางที่ 1 ผลของผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ต่อปลาและกระต่าย

สัตว์ทดลอง	ปริมาณสปอร์โรซีสต์ในสารละลาย/ตู้ หรือ/ตัว	ระยะเวลาที่ศึกษา (เดือน)	อาการของโรคหรือตาย
ปลานิล	8×10^5	1	ปกติ และเมื่อผ่าดูไม่พบซีสต์ในกล้ามเนื้อ
ปลาดุก	8×10^5	1	ปกติ และเมื่อผ่าดูไม่พบซีสต์ในกล้ามเนื้อ
กระต่ายเลี้ยง	2×10^5	4	ปกติ และเมื่อผ่าดูไม่พบซีสต์ในกล้ามเนื้อ

รายงานผลการปฏิบัติงานวิจัยตามรายกิจกรรม ประจำปี 2546

45 06011 014

46 / กองกีฏและสัตววิทยา / กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผล สมุนไพรและเครื่องเทศ

1. **ชื่อแผนงานวิจัย/ชุดโครงการวิจัย** วิจัยแมลงวันผลไม้และการป้องกันกำจัด
2. **ชื่อโครงการวิจัย** การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อนการเก็บเกี่ยว
3. **ชื่อโครงการวิจัยย่อย** -
4. **กลุ่มพืช/พืช** วิทยาการเฉพาะด้าน/มังคุด
5. **สาขาวิชา** กีฏวิทยา
6. **สาขาวิชาย่อย** ชีววิทยา
7. **ชื่อกิจกรรม** การป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยสารสกัดว่านน้ำ (*Acorus calamus* Linn.)
   The Controlling of Fruit Flies by the Extrcct of Sweet Flag (*Acorus calamus* Linn.)
8. **ผู้ดำเนินงาน**
   หัวหน้า เกรียงไกร จำเริญมา
   ผู้ร่วมงาน ศรุต สุทธิอารมณ์ มนตรี จิรสุรัตน์
   อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์
9. **ระยะเวลา** **เริ่มต้น** ตุลาคม 2544 **สิ้นสุด** กันยายน 2545
10. **บทคัดย่อ/รายงานความก้าวหน้า**

รายงานความก้าวหน้า

สารสกัดว่านน้ำ มีสารประกอบกลุ่มต่าง ๆ คือ polysacharides, fat+oil, alkaloids, terpenoids+phenolies และ n-oxides เฉพาะด้านส่วนของ fat+oil เท่านั้นที่ออกฤทธิ์ในการควบคุมศัตรูพืชได้เพราะมีสาร beta-asarone และ methyl-eugenol โดยเฉพาะสาร beta-asarone ทำหน้าที่ anti-juvenile hormone จึงนำสารสกัดจากเหง้าและใบว่านน้ำมาทดสอบกับแมลงวันผลไม้โดยจุ่มผลชุมพู่ พุทรา และลำไย (มีทั้งที่เจาะรูและไม่เจาะรูที่เปลือก) อย่างละ 10 ผล ในสารสกัดจากเหง้าและใบว่านน้ำเข้มข้น 200 ppm (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบมีการวางไข่และมีการเจริญเติบโตของหนอน และจากการศึกษาในมังคุด โดยใช้ผลมังคุดสุกเจาะรูด้วยเข็มลึก 0.2 มิลลิเมตร จุ่มสารสกัดเหง้าว่านน้ำเข้มข้น 100 และ 200 ppm (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้แมลงวันผลไม้ชนิด *Bactrocera carambolae* วางไข่ จากการศึกษา 2 ครั้ง ไม่พบการเจริญเติบโตของ

หนอนแมลงวันผลไม้ชนิดนี้ในมังคุดเลย และจากการผสมสารสกัดว่านน้ำในอาหารเทียมเพื่อดูการเจริญเติบโตและพัฒนาการของแมลงวันผลไม้ พบว่า สารสกัดว่านน้ำอัตราต่างๆ ไม่มีผลต่อการฟักของไข่แมลงวันผลไม้

11. **คำค้น** ว่านน้ำ (*Acorus calamus)* แมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* และ *B. carambolae*

12. **ประเภทผลวิจัย** สิ้นสุด

13. **คำแนะนำผลวิจัย** ถ่ายทอดได้

14. **งบประมาณที่ได้รับทั้งหมด** 24,128 บาท

หมวดค่าจ้างชั่วคราว 11,700 บาท หมวดค่าตอบแทนใช้สอยและวัสดุ 12,428 บาท

15. **งบประมาณที่ใช้จ่ายช่วง 12 เดือน** (เดือนตุลาคม 2545 ถึงเดือนกันยายน 2546)

จำนวน 24,128 บาท : หมวดค่าจ้างชั่วคราว 11,700 บาท

หมวดค่าตอบแทนใช้สอยวัสดุ 12,428 บาท

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชต่างๆที่มีในประเทศไทยในการควบคุมและกำจัดหอยเชอรี่

Screening Test and Field Trial for the Efficacy of Plant Molluscicides Against Golden Apple Snail , *Pomacea* sp.

ชมพูนุท จรรยาเพศ **ปราสาททอง พรหมเกิด**

ศิริพร ซึงสนธิพร **ธีระเดช เจริญรักษ์**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

การศึกษาและสำรวจชนิดพืชที่พบมากในประเทศไทย และมีแนวโน้มจะเป็นพิษต่อหอยเชอรี่ ได้แก่ ประคำดีควาย (*Sapindus emerginatus*) สะเดา DOA (*Azadirachta* sp.) หางไหล DOA (*Derris* sp) แล้วยังมีกากเมล็ดชา (*Camellia* sp.) จากการทดสอบสารสกัดหางไหลของกรมวิชาการเกษตร (rotenone 1.27%) กับหอยเชอรี่ในห้องปฏิบัติการ พบว่าสารสกัดด้วย ethanol อัตรา 200 ppm ทำให้หอยเชอรี่ตาย 100 % ใน 24 ชั่วโมง และสารสกัดจากผลของประคำดีควายทั้งที่สกัดด้วยน้ำและ ethyl alcohol ในอัตรา 0.05 % สามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้ 100 % ภายใน 24 ชั่วโมง สารสกัดสะเดาของกรมวิชาการเกษตร อัตรา 3,500 ppm ทำให้หอยเชอรี่ตาย 100 % ภายใน 24 ชั่วโมง สารสกัดจากจอกไทยและจอกฟิลิปปินส์ไม่มีผลต่อหอยเชอรี่ การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น

คำนำ

การป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ศัตรูข้าวในปัจจุบัน เกษตรกรนิยมใช้สารเคมีและส่วนมากเป็นสารเคมีที่มิใช่สารฆ่าหอย (molluscide) หากแต่เป็นสารฆ่าแมลง (insrcticides) ได้แก่ endosulfan เป็นต้น ซึ่งนอกจากจะมีประสิทธิภาพไม่เทียบเท่าสารกำจัดหอยแล้ว ยังมีผลต่อสภาวะสิ่งแวดล้อมอย่างยิ่ง ทั้งยังทำให้เกิดอันตรายแก่สัตว์น้ำอื่นๆ เช่น ปลาต่างๆ และเป็นอันตรายต่อตัวเกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรมีทางเลือกมากขึ้น ให้เหมาะสมกับท้องที่และสถานภาพของแต่ละบุคคล จึงมีการทดสอบหาพืชที่มีฤทธิ์เป็นสารฆ่าหอย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นพืชหรือวัชพืชที่หาได้ง่ายที่มีอยู่โดยทั่วไปในประเทศ จะเป็นการแก้ไขปัญหาเฉพาะหน้าของเกษตรกรไปได้ส่วนหนึ่ง หรืออีกประการหนึ่งจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะสามารถพัฒนาต่อไปได้

Godan, D. (1983) กล่าวว่าสาร saponin จากต้นพืชเป็นสารชนิดหนึ่งที่ออกฤทธิ์เป็นพิษกับหอยทากน้ำ (freshwater snail) ดังนั้น จึงจะทดสอบพืชที่มีสารนี้ (screen test) โดยแยกส่วนต่างๆนำมาสกัดแล้วทดสอบประสิทธิภาพกับหอยเชอรี่ ซึ่งชมพูนุท และคณะ (2539) ได้ทดสอบสารสกัดจากผลประคำดีควาย

(Soapberry Tree) กับหอยเชอรี่ในห้องปฏิบัติการ พบว่ามีพิษต่อหอยอย่างน่าพอใจ ในประเทศเอธิโอเปียมีการค้นพบพืช endod ซึ่งขึ้นอยู่ในที่สูงกว่า 1400 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล มีพิษต่อหอยน้ำหลายชนิดที่เป็นพาหะทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ในมนุษย์ ทั้งนี้โดยพืชนั้นประกอบด้วยสารพวก glycocide และ saponin เช่นกัน ในปัจจุบันสีสารฆ่าหอยเชอรี่ชนิดหนึ่งซึ่งอยู่ในคำแนะนำให้ใช้ของกรมวิชาการเกษตร โดยชมพูนุท (2540) สาร Protex เป็นพืชบดเป็นผงหยาบจาก Family Termstromiaceae ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศเป็นเหตุให้มีราคาสูง ถ้าสามารถค้นหาพืชในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าหอยได้ดีก็อาจพัฒนาต่อถึงระดับผลิตเป็นการค้าได้ เป็นการลดการนำเข้าและสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*)
2. บีกเกอร์ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. เครื่องชั่ง เครื่องแก้วต่างๆ
4. เวอร์เนีย คาลิปเปอร์
5. สารสกัดจากพืชประคำดีควาย, สะเดา DOA, หางไหล DOA, niclosamide
6. อาหารปลาอัดเม็ดและผักต่างๆ
7. เอทิลแอลกอฮอล์

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 สำรวจชนิดพืชและสารสกัดจากพืชนั้น

โดยคัดเลือกพืชที่มีฤทธิ์เป็นสารฆ่าแมลงหรือฆ่าหอยหรืออยู่ในกลุ่มพืชเป็นพิษ ที่มีสาร saponin หรือสารชนิดอื่น เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย จากนั้นสำรวจดูแหล่งที่พบพืชนั้นๆ มาเก็บรวบรวมเมล็ดหรือส่วนของพืชนำมาปลูกในกระถางในห้องปฏิบัติการเพื่อไว้ใช้ทำสารสกัดต่อไป

สาสกัดจากส่วนต่างๆของพืชนั้นๆที่ห้องปฏิบัติการทางสรีระของพืช กลุ่มงานวิทยาการวัชพืช กองพฤกษศาสตร์และวัชพืช โดยวิธีสกัดด้วยน้ำร้อน น้ำเย็น เอทิลแอลกอฮอล์ 70% การสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์นั้น หลังจากบดส่วนต่างๆของพืช ด้วยเครื่องบดละเอียด (homoginizer) แล้ว กรองเอากากออกมาละลายด้วยเอทานอล 70% นำสารสะลายที่ได้ มากลั่นแล้วระเหยสารละลายออกด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator นำสิ่งสกัดที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากพืชกับหอยเชอรี่ในห้องปฏิบัติการ

เก็บรวบรวมหอยเชอรี่จากแหล่งน้ำต่างๆ มาเลี้ยงไว้ในถังซีเมนต์ในห้องปฏิบัติการอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ให้อาหารปลาอัดเม็ด ผักบุ้ง ผักกระเฉด แหน ผักกาดหอม เป็นอาหาร แล้วคัดเลือกหอยที่แข็งแรงมาทดลอง โดยแบ่งเป็น 3 ขนาด ขนาดใหญ่ กลาง และเล็ก ใส่ในบีกเกอร์ ซึ่งใส่น้ำกรอง 2 ตัว/ซ้ำ ทำการ

ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากพืชที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 นอกจากนี้ทดสอบสารสกัดจากสถาบัน ได้แก่ หางไหลแดง และสะเดา DOA กับหอยเชอรี่ โดยเปรียบเทียบกับกากเมล็ดชา และนิโคลซาไมด์ (ไบลุสไซด์ 70% WP)

การรทดลองที่ 1 ใส่หอยเชอรี่ในบีกเกอร์ 2 ซ้ำๆละ 2 ตัว แล้วทดสอบสารสกัดดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 control
กรรมวิธีที่ 2 niclosamide 50 กรัม/ไร่
กรรมวิธีที่ 3 สะเดา DOA 750 ppm
กรรมวิธีที่ 4 สะเดา DOA 1000 ppm
กรรมวิธีที่ 5 สะเดา DOA 1250 ppm
กรรมวิธีที่ 6 สะเดา DOA 1500 ppm
กรรมวิธีที่ 7 สะเดา DOA 1750 ppm
กรรมวิธีที่ 8 สะเดา DOA 2000 ppm
กรรมวิธีที่ 9 สะเดา DOA 2500 ppm
กรรมวิธีที่ 10 สะเดา DOA 3500 ppm
กรรมวิธีที่ 11 หางไหล DOA 100 ppm
กรรมวิธีที่ 12 หางไหล DOA 200 ppm
กรรมวิธีที่ 13 หางไหล DOA 250 ppm
กรรมวิธีที่ 14 หางไหล DOA 300 ppm
กรรมวิธีที่ 15 หา งไหล DOA 350 ppm

การทดลองที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ CRD 14 กรรมวิธี 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบการใช้ผลประคำดีควายสกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ ตามขั้นตอนที่ 1 กับการสกัดด้วยน้ำร้อน นำมาทดลองกับหอยเชอรี่ โดยใช้สารสกัดประคำดีควายอัตราต่างๆดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สารสกัดประคำดีควาย 5 % (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 2 สารสกัดประคำดีควาย 0.5 % (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 3สารสกัดประคำดีควาย 0.05 % (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 4 สารสกัดประคำดีควาย 0.005 % (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 5 สารสกัดประคำดีควาย 1 % (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 6 สารสกัดประคำดีควาย 0.1% (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 7 สารสกัดประคำดีควาย 0.01% (สกัดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์)
กรรมวิธีที่ 8 สารสกัดประคำดีควาย 5 % (สกัดด้วยน้ำร้อน)

กรรมวิธีที่ 9 สารสกัดประคำดีควาย 0. 5 % (สกัดด้วยน้ำร้อน)
กรรมวิธีที่ 10 สารสกัดประคำดีควาย 0.05 % (สกัดด้วยน้ำร้อน)
กรรมวิธีที่ 11 สารสกัดประคำดีควาย 0.005 % (สกัดด้วยน้ำร้อน)
กรรมวิธีที่ 12 สารสกัดประคำดีควาย 1 % (สกัดด้วยน้ำร้อน)
กรรมวิธีที่ 13 สารสกัดประคำดีควาย 0.1 % ((สกัดด้วยน้ำร้อน)
กรรมวิธีที่ 14 สารสกัดประคำดีควาย 0.01 % (สกัดด้วยน้ำร้อน)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 1 เป็นการทำ screen test เพื่อหาอัตราความเข้มข้นของสารสกัดจากพืชต่างๆ ที่จะเหมาะสมในการกำจัดหอยเชอรี่ ได้ผลตาม table 1 พบว่าสารสกัดสะเดาของกรมวิชาการเกษตร อัตราเริ่มต้นด้วย 1750 ppm จึงจะทำให้หอยเชอรี่เริ่มตายภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากใส่สาร และอัตรานี้ทำให้หอยตาย 100 % ภายหลัง 48 ชั่วโมง สะเดา DOA อัตรา 3500 ppm สามารถทำให้หอยเชอรี่ตายได้ 100 % ภายหลังทดลอง 24 ชั่วโมง สำหรับหางไหล DOA พบว่าอัตรา 100 ppm เริ่มทำให้หอยเชอรี่ตาย 25 % และอัตรา 200 ppm ทำให้หอยตาย 100 % ภายใน 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 ทดสอบเปรียบเทียบระหว่างสารสกัดประคำดีควายที่สกัดด้วย ethylalcohol กับสกัดด้วยน้ำ ได้ผลตาม table 2 ซึ่งแสดงว่าผลประคำดีควายซึ่งสกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกันนั้น สามารถสกัดสาร saponin ซึ่งเป็นสารมีฤทธิ์ฆ่าหอยเชอรี่ได้ออกมาไม่แตกต่างกัน สารสกัดโดยใช้ เอทิลแอลกอฮอล์อัตรา 5 %, 0.5 %, 1.0% , 0.1 % ทำให้หอยตาย 100% ภายหลัง 24 ชั่วโมง และสารที่สกัดดยใช้น้ำอัตรา 0.5 %, 1.0% และ0.1% ทำให้หอยตาย 100% ภายหลัง 24 ชั่วโมง

Table 1 : Laboratory Test on the Extract of Sadao DOA (Azadirachtin) Against Golden Apple Snail

Dose	Mortality in 24 HAT	Mortality in 48 HAT
1. Control	0/4	0/4
2. Niclosamide	4/4	4/4
3. Neem 750 ppm	0/4	0/4
4. Neem 1000 ppm	0/4	¼
5. Neem 1250 ppm	0/4	0/4
6. Neem 1500 ppm	0/4	¾
7. Neem 1750 ppm	¼	4/4
8. Neem 2000 ppm	0/4	2/4
9. Neem 2500 ppm	¼	4/4
10. Neem 3500 ppm	4/4	4/4
11. Rotenone 100 ppm	1/4	¼
12. Rotenone 200 ppm	4/4	4/4
13. Rotenone 250 ppm	4/4	4/4
14. Rotenone 300 ppm	4/4	4/4
15. Rotenone 350 ppm	4/4	4/4

Numerator refers to number of snail dead

Denominator refers to total number of snails used

Table 2 : Laboratory Test on Soapberry fruit with Ethanol Extract and Aqueous Extract

Experiment	7 HAT	24HAT	48HAT
1. EtOH 5 %	0	100	100
2. EtOH 0.5 %	0	100	100
3. EtOH 0.05 %	0	88.89	100
4. EtOH 0.005 %	0	33.33	100
5. EtOH 1.0%	33.33	100	100
6. EtOH 0.1 %	11.11	100	100
7. EtOH 0.01 %	11.11	66.67	100
8. Water 5 %	0	88.89	100
9. Water 0.5 %	11.11	100	100
10. Water 0.05 %	0	88.89	100
11. Water 0.005 %	0	33.33	88.89
12. Water 1.0 %	0	100	100
13. Water 0.1 %	0	100	100
14. Water 0.01 %	0	55.56	88.89

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2540. การป้องกันกำจัดหอยเชอรี่โดยวิธีผสมผสาน. เอกสาร คำแนะนำ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ชมพูนุท จรรยาเพศ ศิริพร ซึงสนธิพร และคณะ .2540. ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากลำโพง (*Datura metal* Linn.) ในการกำจัดหอยเชอรี่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2540. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ชมพูนุท จรรยาเพศ ศิริพร ซึงสนธิพร และทักษิณ อาชวาคม.2539. ทดสอบสารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่และผลกระทบต่อสัตว์น้ำ. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

นิตยา เลาหะจินดา จารุวรรณ สมศิริ และนิพนธ์ มาฆทาน. 2542. แนวทางการควบคุมและกำจัดหอยเชอรี่ เพื่อสิ่งแวดล้อมที่ดีกว่า. เอกสารประกอบการประชุมสัมมานา “ หอยเชอรี่ ครั้งที่ 3 “ โดยกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. ณ โรงแรม โซฟิเทล ราชา ออคิด ขอนแก่น 24 กันยายน 2542.

Alba, M.C; Vertosio,E ; Palis, F.V. ; Macatula, R.F. 1993. The effect of botanical and chemical pesticides against golden apple snail (*Pomacea* sp.) in rice. Pest Management Council of the Philippines, Cebu City. 4-7 May 1993.

Banoc, L.M. and Nariel, L.M. 1992. Utilization of weed extracts for the control of golden snail (*Pomaceae canaliculata* Lamarck). Philippines Journail of Weed Science. 18 : 90-97.

Maini, P.N. and Morallo – Rejesus, B. 1992. Toxicity of some volatile oils against golden apple snail (*Pomacea* sp.) Philippines Journal of Science : 121: 4 : 391-397 ; 1992.

Ponce de Leon, E.L. and Carpo, M.P. 1994. Evaluation of botanical pesticides against golden kuhol (*Pomacea canaliculata*). Philippines Journail of Crop Science. Annual Scientific conference of the Federation of the Crop Science Societies of the Philippines ; Palawan. 16-20 May 1994.

Rejesus, B.M. and Maini, P.N. 1991. Sapogenic plant meterial for golden apple snail (*Pomacea* spp.) control.

ประสิทธิภาพของสารสกัดมะคำดีควาย(*Sapindus emarginatus* Wall)กับสารไดเอทธิลมาเลทต่อหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck) และผลกระทบต่อปลานิล

Efficiency of Soapberry Extract (*Sapindus emarginatus* Wall) and Diethyl malate on Mortality of Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata* Lamarck) and Impact of Nile tilapia (*Tilapia nilotica*)

ปราสาททอง พรหมเกิด ชมพูนุท จรรยาเพศ ธีระเดช เจริญรักษ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพของสารสกัดมะคำดีควายที่ความเข้มข้น 0.03% กับสารไดเอทธิลมาเลท 0.005% สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท เปรียบเทียบกันกรรมวิธีควบคุม (ไม่ใส่สาร) จำนวน 4 ซ้ำตามแผนการทดลอง RCB กับหอยเชอรี่ตัวเต็มวัยมีขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย 36.61 มิลลิเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 13.8 กรัม และผลกระทบต่อลูกปลานิลที่มีขนาดลำตัวกว้างเฉลี่ย 31.69 มิลลิเมตร ยาวเฉลี่ย 80.09 มิลลิเมตร จำนวนชนิดละ 5 ตัวต่อตู้ ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร หลังจากทดลอง 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่าหอยเชอรี่ทุกกรรมวิธียังมีชีวิตอยู่ แต่กรรมวิธีสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท หอยมีอาการป่วยปิดผ่าจมอยู่ก้นตู้ทดลอง ที่ 72 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลทมีอัตราการตายเฉลี่ย5.0±0.0ตัวซึ่งแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดมะคำดีควาย สารไดเอทธิลมาเลทและกรรมวิธีควบคุม คือ 0.0, 0.0 และ 0.0 ตัว ตามลำดับ ที่ P≤0.05 ส่วนผลกระทบต่อปลานิล พบว่าที่ 7 ชั่วโมง ปลานิลยังมีชีวิตอยู่ทุกกรรมวิธี ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดมะคำดีควายผสมกับไดเอทธิลมาเลท สารสกัดมะคำดีควาย และสารไดเอทธิลมาเลทมีอัตราการตาย คือ 2.25±0.82, 1.25±0.43 และ 1.25±0.82 ตัว ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมคือ 0 ตัว ที่ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดมะคำดีควายผสมกับไดเอทธิลมาเลทมีอัตราการตายเฉลี่ย 5.0±0.0 ตัวซึ่งแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดมะคำดีควายและสารไดเอทธิลมาเลทคือ 3.0±0.70 และ 3.25±0.43 ตัว และทุกกรรมวิธีทดสอบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมคือ 0 ตัว

45 06 012 001

คำนำ

หอยเชอรี่ เป็นหอยฝาเดียว น้ำจืด เป็นศัตรูพืชที่สำคัญในข้าว โดยจะกัดกินต้นข้าวระยะกล้า (ชมพูนุทและคณะ, 2532) ในการทำนานั้นเกษตรกรต้องทำการป้องกันกำจัดหอยก่อนทุกครั้ง ด้วยการใช้สารเคมี ทั้งที่เป็นสารกำจัดหอย (molluscicide) เช่น Bayluscide, Dead meal และสารเคมีที่เป็นสารกำจัดแมลง เช่น endosulfan ซึ่งสารนี้มีผลกระทบต่อระบบนิเวศในนาข้าวเป็นอย่างมาก โดยทำให้ปลา กุ้ง กบ เขียด เป็นต้น ตายปริมาณมาก แต่หอยเชอรี่ก็ยังระบาดอยู่ เนื่องจากหอยเชอรี่มีความสามารถเพิ่มจำนวนประชากรได้อย่างรวดเร็ว ด้วยการวางไข่ครั้งละ 388-3,000 ฟอง และไข่มีอัตราการฟักเป็นลูกหอยได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (ชมพูนุทและคณะ, 2534) จึงมีการใช้วิธีการต่างๆ มาป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ โดยวิธีผสมผสาน เช่น วิธีเขตกรรม ด้วยการใช้ตาข่ายกั้นขวางทางน้ำเข้า -ออก ใช้วิธีกลด้วยการเก็บตัวหอยและไข่หอยขึ้นมาทุบทำลาย หรือนำไปเป็นส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเป็ด ไก่ ปลา หรือหมักเป็นปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น ใช้ชีววิธีด้วยการปล่อยเป็ดลงไปกินลูกหอย การใช้สารสกัดจากพืช โดยชมพูนุทและคณะ (2539) ได้ทดสอบสารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่และผลกระทบต่อสัตว์น้ำ หลังการทดสอบ 48 ชั่วโมง พบว่า สารสกัดเทียนหยด อัตรา 2, 4 และ 5 กรัมต่อน้ำ 8 ลิตร ทำให้หอยตาย 46.67, 95.56 และ 95.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดมะไฟนกคุ่ม อัตรา 4, 6 และ 8 กรัมต่อน้ำ 8 ลิตร ทำให้หอยตาย 73.33, 93.33 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดมะคำดีควาย อัตรา 0.1, 0.2, 0.4 และ 0.6 กรัมต่อน้ำ 8 ลิตร ทำให้หอยตาย 37.78, 80.0, 98.56 และ 93.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และผลกระทบต่อปลานิลและปลาตะเพียนขาว คือทั้งเทียนหยดและมะไฟนกคุ่มและมะคำดีควาย ทำให้ปลาทั้ง 2 ชนิดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 ชั่วโมง ปราสาททองและคณะ (2545) รายงานว่า สารสกัดมะคำดีควายที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อของอวัยวะกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ตับ ริ้วเหงือก ไตและเท้า ของหอยเชอรี่ถูกทำลาย ส่งผลให้หอยตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่เวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากสารสกัดมะคำดีควายมีสาร saponin ซึ่งมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีคล้ายสบู่ ลดแรงตึงผิวของเซลล์ (Hostettmann et..al, 1991) มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลือดเย็นโดย saponin จะไปทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Marston and Hostettmann, 1991) ทำให้เกิดการระคายเคืองของผนังลำไส้ การดูดซึมลดลง อาจทำให้เซลล์ตายได้ โดย saponin จะรวมตัวกับไขมันของผนังเซลล์ ทำให้เกิดการแตกแยกของผนังเซลล์ส่งผลให้เซลล์แตก (Agarwal and Rastogi, 1974) ซึ่งจากคุณสมบัติของ saponin เหล่านี้ เป็นการบ่งบอกถึงศักยภาพของสารสกัดมะคำดีควายที่จะใช้ป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ได้ดี แต่เนื่องจากฤทธิ์ของ saponin ไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของสัตว์เลือดเย็นจึงมีผลกระทบต่อสัตว์น้ำบ้างในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ดังนั้นจึงได้ทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมด้วยการลดความเข้มข้นของสารสกัดมะคำดีควาย (sub lethal dose) แล้วนำไปผสมกับสารเสริมฤทธิ์เพื่อที่จะทำให้หอยตาย และไม่มีผลกระทบต่อสัตว์น้ำหรือมีผลกระทบให้น้อยที่สุด จึงใช้สารไดเอทธิลมาเลท เป็นสารเสริมฤทธิ์เนื่องจากจะไปยั้บยั้งการทำงานของเอนไซม์ glutathion-s-transferase (Visetson, 1991) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบกลไกทำลายพิษ (detoxification) ในปฏิกิริยาระยะที่ 2 คือ คอนจูเกชั่น (Conjugation reaction) โดยมีกลไกการ

ทำงานของเอนไซม์ คือ เมื่อมีสารแปลกปลอมจากภายนอกเข้าไปในเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้จะเข้าไปเป็นตัวเร่งให้สารเหล่านั้น มีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้น หรือทำให้สารดังกล่าว เป็นสารที่มีขั้ว เพื่อที่จะสามารถกำจัดออกนอกร่างกาย หรือทำให้สารแปลกปลอมเหล่านั้นหมดความเป็นพิษ หรือมีพิษน้อยลง แล้วขับออกจากเซลล์ได้โดยง่าย ดังนั้นการศึกษาทดลองด้วยการใช้สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารเสริมฤทธิ์คือสารไดเอทธิลมาเลท จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจและเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาทดลองในการผสมสารสกัดจากพืชกับสารอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช และช่วยลดมลภาวะของระบบนิเวศได้

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง
   1.1 หอยเชอรี่ตัวเต็มวัย จำนวน 80 ตัว
   1.2 ลูกปลานิล อายุ 2 เดือน จำนวน 80 ตัว
2. เครื่องมือ
   2.1 อุปกรณ์สกัดสารมะคำดีควาย
   2.2 เครื่องชั่งน้ำหนักและเวอร์เนียร์
   2.3 ปิเปต ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
   2.4 บิกเกอร์ ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร
   2.5 ตู้กระจก ขนาด 25x40x25 เซนติเมตร จำนวน 16 ตู้
3. สารเคมี
   3.1 สารสกัดมะคำดีควาย
   3.2 สารไดเอทธิลมาเลท

วิธีการ

1. แผนการทดลอง วางแผนแบบ RCB 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำ
   1.1 ไม่ใส่สาร (0%)
   1.2 ใส่สารสกัดมะคำดีควาย 0.03%
   1.3 ใส่สารไดเอทธิลมาเลท 0.005%
   1.4 ใส่สารสกัดมะคำดีควาย 0.03% ผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท 0.005%
2. เตรียมตู้ทดลอง
   ใช้ตู้กระจกขนาด 25x40x25 เซนติเมตร จำนวน 16 ตู้ ล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง แล้วใส่น้ำประปากรอง ปริมาตร 5 ลิตรต่อตู้

3. เตรียมสัตว์ทดลอง

   3.1 นำหอยเชอรี่ตัวเต็มวัยจากโรงเลี้ยงหอยของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร มาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดหอยทุกตัว ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 13.8 กรัม มีความยาวเปลือกเฉลี่ย 36.61 มิลลิเมตร ใส่ตู้ทดลองที่เตรียมใส่น้ำไว้แล้ว (ข้อ 2) จำนวน 5 ตัวต่อตู้ ปล่อยให้หอยปรับตัวอยู่ในตู้ทดลอง 1 คืน

   3.2 นำลูกปลานิลที่ซื้อจากร้านขายพันธุ์ปลา มาเลี้ยงที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร 1 คืน เพื่อให้ปลาแข็งแรง จากนั้นนำปลานิลแต่ละตัวมาวัดขนาดลำตัว ซึ่งมีความกว้างเฉลี่ย 31.69 มิลลิเมตร ความยาวเฉลี่ย 80.09 มิลลิเมตร นำปลาใส่ตู้ทดลอง จำนวน 5 ตัวต่อตู้ รวมกับหอยเชอรี่ (ข้อ 3.1) ปล่อยให้ปลาปรับตัวในตู้ทดลอง 1 คืน

4. เตรียมสารสกัดมะคำดีควาย

   ชั่งน้ำหนักเนื้อของผลสุกมะคำดีควายมา 10 กรัม เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร ทำการสกัดโดยวิธีต้มแต่ไม่เดือด (อุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส) นาน 90 นาที กรองเอาส่วนกากออก จะได้น้ำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 10% (น้ำหนักต่อปริมาตร; w/v)

5. การทดสอบ

   นำสารสกัดมะคำดีควายที่ความเข้มข้น 0.03% สารไดเอทธิลมาเลท 0.005% และสารสกัดมะคำดีควาย 0.03% ผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท 0.005% แต่ละกรรมวิธีนี้ใส่ในตู้ทดลองที่ใส่หอยเชอรี่และปลานิลไว้แล้ว คนให้สารละลายเข้ากัน ส่วนกรรมวิธีควบคุมไม่ใส่สาร (0%) ทำเช่นนี้ตามแผนการทดลองที่กำหนด จากนั้นตรวจเช็คอัตราการตายของหอยเชอรี่ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และผลกระทบต่อปลานิลที่ 7, 24 และ 48 ชั่วโมง

6. บันทึกข้อมูล

   6.1 อัตราการตายของหอยเชอรี่ ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

   6.2 อัตราการตายของปลานิล ที่ 7, 24 และ 48 ชั่วโมง

   6.3 ขนาดและน้ำหนักของหอยเชอรี่และปลานิล

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของสารสกัดมะคำดีควายที่ความเข้มข้น 0.03 % กับสารไดเอทธิลมาเลท เข้มข้น 0.005 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดมะคำดีควาย 0.03 % ผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท 0.005 % และกรรมวิธีควบคุม(ไม่ใส่สาร) กับหอยเชอรี่ตัวเต็มวัยที่มีขนาดความยาวเปลือกเฉลี่ย 36.61 มิลลิเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 13.8 กรัมและผลกระทบต่อปลานิลขนาดความกว้างลำตัวเฉลี่ย 31.69 มิลลิเมตร ความยาวเฉลี่ย 80.09 มิลลิเมตร ดังนี้

ผลต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่

ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง หอยเชอรี่หลังได้รับสารสกัดมะคำดีควาย สารไดเอทธิลมาเลท สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท และกรรมวิธีควบคุม พบว่าหอยทุกกรรมวิธีมีชีวิตอยู่ แต่หอยในกรรมวิธี สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท มีอาการป่วยจะปิดฝาจมอยู่ที่พื้นตู้ทดลอง

ที่ 72 ชั่วโมง หอยเชอรี่ที่ได้รับสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท พบว่า มีอัตราการตายสูงเฉลี่ย 5.0±0.0 ตัว ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดมะคำดีควาย สารไดเอทธิลมาเลท และกรรมวิธีควบคุม คือ 0.0, 0.0 และ 0.0 ตัวตามลำดับที่ $P \leq 0.05$

หอยเชอรี่หลังจากได้รับสารสกัดมะคำดีควาย สารไดเอทธิลมาเลทนาน 72 ชั่วโมงแล้วยังพบว่าหอยมีชีวิตอยู่ อาจจะเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารทดสอบทั้ง 2 ชนิด อยู่ในระดับไม่ทำให้หอยตาย (sub lethal dose) สอดคล้องกับรายงานของปราสาททองและคณะ (2545) ที่พบว่าหอยเชอรี่จะยังคงมีชีวิตอยู่หลังได้รับสารสกัดมะคำดีควายเข้มข้น 0.001 และ 0.005 % เมื่อนำสารสกัดมะคำดีควายมาผสมกับสารไดเอทธิลมาเลทแล้ว พบว่าทำให้หอยเชอรี่ตาย 5.0±0.0 ตัวนั้น เป็นการบ่งบอกว่าสารทดสอบเหล่านี้เมื่อนำมาผสมกันแล้วจะมีฤทธิ์ส่งเสริมกัน จึงส่งผลให้หอยตาย เพราะว่าสารสกัดมะคำดีควายมีสาร saponin ที่มีฤทธิ์ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก (Marston and Hostettmann, 1991) และยังทำให้เซลล์ในอวัยวะต่างๆ ของหอยเชอรี่ถูกทำลาย (ปราสาททองและคณะ, 2545) ส่วนสารไดเอทธิลมาเลทเป็นสารที่ยับยั้งเอนไซม์ glutathion-s-transferase (Visetson, 1991) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบกลไกทำลายพิษ (detoxification) ในปฏิกิริยาระยะที่ 2 คือคอนจูเกชั่น (Conjugation reaction) เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดมะคำดีควายที่ความเข้มข้นไม่ทำให้หอยตาย พร้อมกับสารไดเอทธิลมาเลทที่ไปยับยั้งกลไกการทำลายพิษ จึงทำให้สารพิษสะสมอยู่ภายในเซลล์จนส่งผลให้หอยตายในที่สุด

ผลกระทบต่อปลานิล

ที่ 7 ชั่วโมง ปลานิลหลังได้รับสารสกัดมะคำดีควาย สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท และกรรมวิธีควบคุม พบว่าปลานิลยังมีชีวิตอยู่

ที่ 24 ชั่วโมง ปลานิลที่ได้รับสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท สารสกัดมะคำดีควาย และสารไดเอทธิลมาเลท มีอัตราการตายเฉลี่ยคือ 2.25±0.82, 1.25±0.43 และ 1.25±0.82 ตัวตามลำดับ และทุกกรรมวิธีทดสอบแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมมีอัตราการตาย 0 ตัว ($P \leq 0.05$)

ที่ 48 ชั่วโมง ปลานิลที่ได้รับสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท มีอัตราการตาย 5.0±0.0ตัวซึ่งแตกต่างทางสถิติกับสารสกัดมะคำดีควาย และสารไดเอทธิลมาเลทคือ 3.0±0.70 และ 3.25±0.43 ตัว และทุกกรรมวิธีทดสอบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุมที่มีอัตราการตาย 0 ตัว

ปลานิล หลังจากได้รับสารสกัดมะคำดีควาย สารไดเอทธิลมาเลท สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท นาน 7 ชั่วโมง พบว่าปลายังมีชีวิตอยู่ จนกระทั่งนาน 24 ชั่วโมง พบว่าปลาตายไม่ถึง 50 % ในกรรมวิธีทดสอบของสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท สารสกัดมะคำดีควายและสาร

ไดเอทธิลมาเลท ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารเสริมฤทธิ์เหล่านี้ มีแนวโน้มส่งผลกระทบต่อปลานิลลดลง เพราะว่าจากรายงานของชมพูนุทและคณะ (2539) พบว่าสารสกัดมะคำดีควายในอัตราที่ทำให้หอยเชอรี่ตายมีผลทำให้ปลานิลตาย 100 % ภายในเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 อัตราการตายของหอยเชอรี่ (5 ตัวต่อตู้) หลังจากทดสอบ 72 ชั่วโมง

กรรมวิธี	ซ้ำ				เฉลี่ย
	1	2	3	4	
ควบคุม 0%	0	0	0	0	0.0^{b}
สารสกัดมะคำดีควาย 0.03%	0	0	0	0	0.0^{b}
สารไดเอทธิลมาเลท 0.005%	0	0	0	0	0.0^{b}
สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท	5	5	5	5	5.0 ± 0.0^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 อัตราการตายของปลานิล (5 ตัวต่อตู้) หลังจากทดสอบ 24 ชั่วโมง

กรรมวิธี	ซ้ำ				เฉลี่ย
	1	2	3	4	
ควบคุม 0%	0	0	0	0	0.0^{a}
สารสกัดมะคำดีควาย 0.03%	1	2	1	1	1.25 ± 0.43^{b}
สารไดเอทธิลมาเลท 0.005%	0	2	2	1	1.25 ± 0.82^{b}
สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท	1	3	3	2	1.33 ± 0.94^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 อัตราการตายของปลานิล (5 ตัวต่อตู้) หลังจากทดสอบ 48 ชั่วโมง

กรรมวิธี	ซ้ำ				เฉลี่ย
	1	2	3	4	
ควบคุม 0%	0	0	0	0	0.0^{a}
สารสกัดมะคำดีควาย 0.03%	3	4	2	3	3.0 ± 0.70^{b}
สารไดเอทธิลมาเลท 0.005%	3	3	4	3	3.25 ± 0.43^{b}
สารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท	5	5	5	5	5.0 ± 0.0^{c}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยวิธี DMRT

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง พบว่า สารสกัดมะคำดีควาย 0.03 % ผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท 0.005 % ทำให้หอยเชอรี่ตายสูง 5.0±0.0 ตัว ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนผลกระทบต่อปลานิลนั้นพบว่าที่ 7 ชั่วโมง หลังจากทดสอบปลานิลยังมีชีวิตอยู่ทุกกรรมวิธี และที่ 24 ชั่วโมง ปลานิลตายไม่ถึง 50 % ของกรรมวิธีสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท สารสกัดมะคำดีควาย และสารไดเอทธิลมาเลท และที่ 48 ชั่วโมง ปลานิลจึงตาย 100% ในกรรมวิธีที่ผสมสารสกัดมะคำดีควายกับสารไดเอทธิลมาเลท นั่นเป็นการบ่งบอกถึงสารสกัดมะคำดีควายผสมกับสารไดเอทธิลมาเลท มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้กำจัดหอยเชอรี่ได้ดี โดยมีผลกระทบต่อปลานิลน้อยและอาจจะมีผลต่อสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ลดลงด้วย

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ , ทักษิณ อาชวาคม และทรงทัพ แก้วตา . 2532. ทดสอบอัตราการกินต้นข้าวของหอยเชอรี่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 115-125.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ทักษิณ อาชวาคม และทรงทัพ แก้วตา . 2534. ชีววิทยาของหอยเชอรี่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 94-102.

ชมพูนุท จรรยาเพศ , ศิริพร ซึงสนธิพร และทักษิณ อาชวาคม . 2539. ทดสอบสารสกัดจากพืชในการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่และผลกระทบต่อสัตว์น้ำ. รายงานผลการวิจัย. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 264-265.

ปราสาททอง พรหมเกิด , ชมพูนุท จรรยาเพศ , ปิยาณี หนูกาฬและธีระเดช เจริญรักษ์ . 2545. ผลของสารสกัดมะคำดีควายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata* Lamarck). การประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 13 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 75-90.

Agarwal, S.K. and R.P.Rastogi. 1974. Triterpenoid saponins and their genins. Phytochemistry. 13 : 2623-2645.

Hostettmann, K., M.Hostettmann. and A. Marston. 1991. Saponin. pp.435-471. In B.V. Charlwood and D.V. Banthorpe (ed.) vol.7 of Methods in Plant Biochemistry J.B. Harborne and P.M. Dey (ed.) Terpenoids. Academic Press. London.

Marston, A. and K.Hostettmann. 1985. Plant molluscicides. Phytochemistry. 24 : 639-652.

Visetson,S. 1991. Insecticide resistance mechanism in the rust red flour beetle, *Tribolium cestaneum* (Herlrt) Ph.D.thesis. The University of Sydney, Australia.

ผลของสารสกัดจากพืชต่อหนูท้องขาวบ้าน *Rattus rattus*

Effect of Plant Extract ed on Roof Rat ; *Rattus rattus*

ปราสาททอง พรหมเกิด
กรแก้ว เสือสะอาด
เสริมศักดิ์ หงส์นาค
ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ
กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร
กองกีฏและสัตววิทยา

บทคัดย่อ

ผลของสารสกัดมะคำดีควาย อัตรา 8 กรัมต่อกิโลกรัม เทียนหยด อัตรา 8 กรัมต่อกิโลกรัม ลำโพง อัตรา 8 กรัมต่อกิโลกรัม มะกล่ำตาหนู อัตรา 4 กรัมต่อกิโลกรัม และน้ำกลั่นต่อหนูท้องขาวบ้านที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 204.1 กรัม ตามแผนการทดลอง RCB 5 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ตัวในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา โดยป้อนสารสกัดลงในกระเพาะอาหารด้วยหลอดป้อนอาหาร ตามอัตราที่กำหนดตามแผนการทดลองปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อตัว หลังทดสอบ 7 วันและ 15 วันพบว่าหนูท้องขาวบ้านที่ทดสอบด้วยสารสกัดมะคำดีควาย เทียนหยด ลำโพง มะกล่ำตาหนู และน้ำกลั่นมีอัตราการตายเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีเท่ากันคือ 0, 0, 0, 75 และ 0 % ตามลำดับ

คำนำ

พืชเป็นผู้ผลิตสารประกอบต่าง ๆ เพื่อเป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตทั้งพืชเองและสัตว์ผู้บริโภค แต่มีพืชบางชนิดผลิตสารประกอบที่เป็นพิษออกมาเพื่อป้องกันตัวเอง จากศัตรูผู้รุกรานได้แก่ โรคจากเชื้อราและแบคทีเรีย สัตว์และแมลงที่มากัดกินสารพิษเหล่านี้ได้แก่ alkaloid และ Cyanogenic glycoside เป็นต้น จากคุณสมบัตินี้จึงศึกษาความเป็นพิษของมะคำดีควาย เทียนหยด ลำโพง และมะกล่ำตาหนู ต่อหนูท้องขาวบ้าน

มะคำดีควาย (Soapbery tree) ; *Sapindus emaginatus* อยู่ในวงศ์ Sapindaceae เป็นไม้ยืนต้น ใบเป็นใบประกอบ ใบย่อยเป็นรูปไข่กว้าง 5-7 ซม. ยาว 10-14 ซม. ช่อดอกปลายกิ่ง แยกเพศ เนื้อของผลมีสารพิษเรียกว่า saponin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เป็นสารละลายน้ำได้คล้ายสบู่ (Hostettmann et. al.1991) สามารถรวบตัวกับไขมันทำให้เกิดการแตกแยกของผนังเซลล์ (Agarwal and Rastogi, 1974) มีความเป็นพิษต่อสัตว์เลือดเย็นทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Marston and Hostett;mann 1985)

เทียนหยด (golden dewdrop) ; *Durnta repens* L. อยู่ในวงศ์ Verbenaceae เป็นไม้พุ่มสูง 2-4 เมตร ใบเรียบ ดอกเป็นช่อ กลีบดอกสีม่วงหรือขาว พิษของเทียนหยดอยู่ที่ผล (รุ่งระวี, 2538)

รหัสทะเบียนวิจัย 45 06 012 002

ลำโพง *Datura metel* L. เป็นไม้ล้มรุกอายุ 1-2 ปีสูงประมาณ 2 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยวขนาดใหญ่รูปไข่ปลายในแหลม ดอกเดี่ยว ผลกลมเท่ามะเขือเปราะ ทุกส่วนของต้นมีสารพิษได้แก่ alkaloid scopolamine (hyoscine) hyoscyamine , atropine มีผลต่อระบบประสาท (ลัดดาวัลย์และถนอม จิต ; 2522)

มะกล่ำตาหนู *Abrus precatarius* L. อยู่ในวงศ์ Euphobiaceae เป็นพืชเลื้อยใบเป็นใบประกอบหลายใบรวมกันคล้ายขนนก ดอกเหมือนดอกถั่ว สีม่วงแดงหรือขาว ผลเป็นฝักสีเขียวจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ ภายในฝักมีเมล็ด 4-8 เมล็ดเมื่อแก่เต็มที่จะมีสีแดงสด (Martom, 1970) ส่วนของเมล็ดจะมีสารพิษคือ abrin a-d เป็นสารกลุ่ม lectin มีฤทธิ์ต่อเซลล์ของตับและไต และเซลล์เมล็ดเลือดแดง (Hart, 1963) โดยสาร abrin จะไปจับกับ galactosyl terminated receptors ของผนังเซลล์มีฤทธิ์ยับยั้ง ribosome สังเคราะห์โปรตีนและทำให้เซลล์ตาย (Stripe and Barbieri, 1986) albrin มีพิษมากเมื่อฉีดเข้าหลอดเลือดทำให้หนูตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) เท่ากับ 0.02 ไมโครกรัม (Budavari, 1989)

ดังนั้นการศึกษาสารพิษจากพืชเหล่านี้ มาใช้ป้องกันกำจัดหนูท้องขาวบ้านจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ทดแทนสารเคมีได้และปลอดภัยจากสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูท้องขาวบ้าน ; *Rattus rattus*

1.2 สารสกัดจากพืช

มะคำดีควาย ; *Sapindus emaginatus* Wall

เทียนหยด ; *Duranta repens* L.

ลำโพง ; *Datura metet* L.

มะกล่ำตาหนู ; *Abrus precatorius* Linn.

1.3 เครื่องมือ

กรงเลี้ยงทดสอบหนู

น้ำและอาหารเลี้ยงหนู

เครื่องบดเมล็ดพืช

เครื่องสกัดแบบ soxhlet

เครื่องชั่งน้ำหนัก

หลอดป้อนอาหาร (feeder tube)

วิธีการ

เตรียมสัตว์ทดลอง

รวบรวมหนูท้องขาวบ้านด้วยการใช้กรงดักชนิดจับเป็นจากสวนผลไม้และบ้านเรือนจากจังหวัดนนทบุรี มาเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา นาน 7 วันแล้วคัดเลือกหนูตัวเต็มวัย แข็งแรง มาชั่งน้ำหนักหนูทุกตัวแล้วแยกเลี้ยงในกรงทดลอง กรงละ 1 ตัว

เตรียมสารสกัด

ทำการสกัดสารมะคำดีควาย เทียนหยดและลำโพงด้วย soxhlet โดยใช้น้ำเป็นตัวทำลาย แล้วเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้เย็น ส่วนเมล็ดมะกล่ำตาหนูนำมาบดด้วยเครื่องบดจนเป็นผลแป้งแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

การทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. สารสกัดมะคำดีควาย 8 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
2. สารสกัดเทียนหยด 8 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
3. สารสกัดลำโพง 8 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
4. สารสกัดมะกล่ำตาหนู 4 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
5. น้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร

นำหนูที่จัดเตรียมไว้แล้วนั้นมาป้อนสารสกัดแต่ละชนิดด้วยวิธี feeding tube คือป้อนสารเข้าสู่กระเพาะอาหารหนู แล้วสังเกตบันทึกอัตราการตายของหนูต่อไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองป้อนสารสกัดมะคำดีควายอัตรา 8 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เทียนหยดอัตรา 8 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ลำโพงอัตรา 8 กรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม มะกล่ำตาหนู 4 กรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัมและกลุ่มควบคุมที่ป้อนน้ำกลั่น โดยแต่ละกรรมวิธีให้สารละลาย 3 มิลลิลิตรกับหนูท้องขาวบ้านแต่ละตัวซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 204.1 กรัม **(ตารางที่ 2)**

หลังทดสอบ 7 วันพบว่าหนูที่ทดสอบสารสกัดมะคำดีควาย เทียนหยด ลำโพง มะกล่ำตาหนูและน้ำกลั่น มีอัตราการตายเฉลี่ย 0, 0, 0, 75 และ 0 % ตามลำดับและหลังทดสอบ 15 วัน หนูทุกกรรมวิธีมีอัตราการตายเท่ากับหลังทดสอบ 7 วัน **(ตารางที่ 1)**

การที่สารสกัดมะกล่ำตาหนูทีประสิทธิภาพฆ่าหนูได้มากถึง 75 % แสดงว่าสาร abrin ซึ่งเป็นโปรตีนอยู่ในเมล็ดมะกล่ำตาหนูอาจจะไปทะลายเซลล์ของตับ ไต และเม็ดเลือดแดง (Hart, 1963) และสาร abrin ยังไปจับกลับ galactosyl terminated receptors ของผนังเซลล์มีผลยับยั้ง ribosome สังเคราะห์โปรตีนส่งผลให้เซลล์ตาย (Stripe and Barbieni, 1986) ส่วนสารสกัดมะคำดีควาย เทียนหยด ซึ่งสารออกฤทธิ์คือ saponin นั้นหนูอาจจะได้รับไม่ถึงขนาดทำให้ตาย (lethal dose) โดยสาร

saponin ไม่สามารถทำลายผนังเซลล์ เหยื่อบุ ผนังกระเพาะ และลำไส้จึงไม่ทำให้เซลล์เหยื่อบุผิวของทางเดินอาหารแตกทำลายตามคุณสมบัติของ saponin (Agrawal and Rastogi, 1974) หรือสารนี้อาจจะถูกทำลายทำให้หมดฤทธิ์ที่กระเพาะอาหาร หรือลำไส้ หรือไม่สามารถดูดซึมผ่านเข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือดได้จึงไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก ดังคุณสมบัติของสาร saponin ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (Marston and Hostettmann, 1985) และสารสกัดลำโพงก็เช่นเดียวกัน อาจจะไม่มีปริมาตรสาร alkaloid scopolamine, hyosacyamine and atropine พอที่จะทำลายระบบประสาทของหนูได้

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราการตาย (%) ของหนูท้องขาวบ้าน (จำนวน 4 ตัว แต่ละกรรมวิธี) หลังการทดสอบด้วยสารสกัดมะคำดีควาย เทียนหยด ลำโพง มะกล่ำตาหนู และน้ำกลั่น โดยแต่ละกรรมวิธีให้ปริมาณ 3 มิลลิลิตรเป็นเวลา 7 และ 15 วัน

กรรมวิธี	อัตราการตาย (%)	
	7 วัน	15 วัน
มะคำดีควาย (8g/kg)	0	0
เทียนหยด (8g/kg)	0	0
ลำโพง (8g/kg)	0	0
มะกล่ำตาหนู (4g/kg)	75	75
น้ำกลั่น	0	0

ตารางที่ 2 น้ำหนักหนูท้องขาวบ้าน

กรรมวิธี	น้ำหนัก (กรัม)				
	1	2	3	4	เฉลี่ย
มะคำดีควาย	170.2	212	197.3	184.6	191.0
เทียนหยด	189.5	223.4	242.2	192.1	211.8
ลำโพง	205.0	164.7	189.3	225.0	196.0
มะกล่ำตาหนู	243.0	193.1	231.4	187.8	213.8
น้ำกลั่น	239.1	184.5	209.6	199.5	208.2
เฉลี่ย					204.1

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมะคำดีควาย เทียนหยด ลำโพง มะกล่ำตาหนู ปรากฏว่าสารสกัดมะกล่ำตาหนู ซึ่งมีสาร abrin มีฤทธิ์ฆ่าหนูมากถึง 75 % จึงน่าจะนำมาศึกษาพัฒนาต่อไปเพื่อที่จะนำไปประยุกต์เป็นเทคโนโลยีควบคุมหนูท้องขาวบ้าน และหนูชนิดอื่น ๆ ต่อไป และเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ควบคุมหนูแทนสารเคมี ทั้งปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ส่วนสารสกัดมะคำดีความ เทียนหยด ลำโพง ตามอัตราที่ทดสอบยังไม่ทำให้หนูตาย

เอกสารอ้างอิง

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. 2538. พรรณไม้มีพิษ. ภาควิชาเภสัชพฤษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 60 หน้า.

ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ และถนอมจิต สุภาวิตา. 2522. ซึ่งพืชสมุนไพรและประโยชน์. 109 หน้า.

Agarwal, S.K. and R.P. Rastogi. 1974. Triterpenoid saponins and Their genins. Phy to chemistry. 13 : 2633-2645.

Budavari, S. 1989. The Merck Index : an eneyclopedia of chemieals drugs and biologicals 10 th ed. Rahway, New jersey, Merck and Co., Inc.

Hart, M. 1963. Jequirity bean Poisoning. J. Med. 268 : 885-6

Hostettman n, K., M. Hostettman n and A. Marston, 1991. Saponin, PP. 435-471. In B.V. Charlwood and D.V. Banthorpe (ed.) Vol. 7 of Methods in Plant Biochemistry J.B. Harbone and P.M. Dey (ed.) Terpenoids. Academic Press. London.

Marston, A. and K. Hostettman n. 1985. Plant molluscicides. Phytochemistry. 24, 639 – 652.

Morton, J.F. 1970 Plamt Poisonous to People University of Mioney. P.25

Stripe, F. and L. Barbieri. 1986. Symposium : Molecular Mechanisms of toxicity. Toxic Lectins From Plants. Human Toxicology 5 (2) : 108-9.

การตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในน้ำด้วยวิธี ELISA

Detection of *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water by ELISA Technique

วงศ์ บุญสืบสกุล

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล **รุ่งนภา คงสุวรรณ์**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

Ralstonia solanacearum เป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวที่ทำความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดและปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่าสารเคมีใดให้ผลในการควบคุมโรคนี้ได้ดีพอควรแก่การแนะนำ ดังนั้นแนวทางในการควบคุมโรคนี้จึงเน้นที่การป้องกันและคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อนี้ที่ทำให้เกิดโรคระบาดได้เพราะเชื้อนี้สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ดีดังนั้นถ้าสามารถตรวจได้ว่าน้ำที่จะนำมาใช้เพื่อการเกษตรว่ามีเชื้อนี้ปนอยู่หรือไม่ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมและป้องกันโรคนี้ ในการทดลองนี้ได้วิจัยหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ที่ติดมาในน้ำโดยทดสอบการตรวจหาเชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้น 10^5,$10^4$$10^3$,$10^2$ และ 10 cfu. ต่อ มล ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่อ่านได้จากเครื่อง ELISA reader เป็นลบกับความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^3,10^2 และ 10 cfu. ต่อ มล ขณะที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^4 ได้ค่าปฏิกิริยาที่ค่อนข้างต่ำ(0.587-0.284) ตามลำดับ แต่ถ้านำสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นปริมาตร 250 ul. มาเลี้ยงในอาหารเหลว SMSA 750 ul. ที่ 37^{o} ซ นาน 48 ชม บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที แล้วนำอาหาร SMSA นี้มาตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาสูงขึ้นเป็นบวกกับทุกความเข้มข้นของเชื้อและอ่านค่าของปฏิกิริยาดังกล่าวได้ 1.385, 1.121, 1.112, 1.212 และ 1.023 ตามลำดับความเข้มข้นดังกล่าวและถ้านำสารละลายเชื้อดังกล่าวมากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียขนาด 0.2 ไมครอนหรือหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วละลายตะกอนเซลด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหาระ SMSA ในสภาพเดียวกับที่กล่าวแล้วข้างต้นจากนั้นนำมาตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าวิธีหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายเชื้อโดยตรงและการกรองเชื้อ โดยวิธีหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลสามารถวัดค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาได้ 2.584, 2.486, 2.348, 2.337 และ

รหัส 44 11 002 001

2.078 ตามลำดับ ซึ่งวิธีการนี้เมื่อนำไปใช้ตรวจหาเชื้อดังกล่าวจากตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านแปลงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวในธรรมชาติก็พบว่าวิธีหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลก่อนนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA ดังกล่าวสามารถตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงโดยวัดค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาได้ 2.356 ถึง 2.886

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* เป็นเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวทำความเสียหายให้แก่พืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด จาก การศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยว ของมันฝรั่งกับมันฝรั่ง 17 พันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยพบว่าไม่มีพันธุ์ไหนที่ต้านทานต่อโรคนี้ (วงศ์,2535 และ 2536) ผลการทดลองหาคุณสมบัติชนิดของ biovar ของเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในประเทศไทยพบว่าเป็น biovar 2, 3 และ 4 (วงศ์, 2537ก) มีรายงานว่าสารสกัดจากพืชตระกูลพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในห้องปฏิบัติการได้ (วงศ์,2537 ก และ2541ก) ได้มีการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ *R.solanacearum* และถูกนำมาตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศและตรวจพบเชื้อดังกล่าวในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ (วงศ์, 2538 และ2541ข) Martin and French (2000); French, (1994); French *et al.,* (1975) ได้สรุปแนวทางในการควบคุมโรคนี้ว่าโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวต้องเน้นที่การป้องกันถ้าเกิดโรคระบาดแล้วสารเคมีไม่สามารถควบคุมโรคนี้ได้และไม่แนะนำให้ใช้พร้อมเสนอแนะให้ใช้วิธีสมทบ(integrated control) โดยมีกลยุทธต่าง ๆ สำหรับป้องกันโรคนี้ได้แก่ หัวพันธุ์ ดิน และน้ำที่ปลอดจากเชื้อนี้ , การปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อนี้เพื่อตัดวงจรชีวิตของเชื้อ, การเฝ้าระวังและกำจัดต้นเป็นโรคในแปลง, การปรับโครงสร้างดินให้มีการระบายน้ำที่ดีและระมัดระวังการติดเชื้อไปกับเครื่องไม้เครื่องมือทางการเกษตร เป็นต้น อย่างไรก็ดีคุณสมบัติที่สำคัญของเชื้อนี้ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรคระบาดได้คือเชื้อนี้สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้ดีทำให้เกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงและรวดเร็วจนไม่สามารถที่จะควบคุมโรคไว้ได้ดังนั้นถ้าสามารถตรวจได้ว่าน้ำที่จะนำมาใช้ เพื่อการเกษตรมีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการป้องกันไม่ให้โรคนี้แพร่ระบาด ในการทดลองนี้จะได้วิจัยหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ที่ติดมากับน้ำได้อย่างถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว.

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง
2. เครื่องมือสำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียง หลอดทดลอง ธรรมดาและชนิดฝาเกลียว จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แอลกอฮอล ล์ 70 % เครื่องกรองและกระดาษกรองเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น
3. ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28^{o}-30^{o} ซ
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) และเครื่องเขย่าทั้งชนิด Vortex mixer และ Rotary shaker ที่สามารถปรับความเร็วรอบได้
5. เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ Hitachi 160.E สำหรับวัดความข้มขันของเชื้อแบคทีเรีย
6. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับทำ Indirect ELISA เช่น primary antiserum เป็น polyclonal antibody ที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อ *R.solanacearum* ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง, ELISA reader, carbonate buffer, Washing buffer ชนิด PBS-T, Mini washing Danatech laboratory Inc, ABC-kit (Avidin-biotinylated enzyme complex ของ Vector laboratory Inc., APH (Avidin conjugate with enzyme peroxidase complex dilute with hydrogenperoxide), สารที่ทำให้เกิดสี (substrate) ABTS (2,2-azino-di-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate และ หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS sodium dodecyl sulfate เป็นต้น
7. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA, SMSA (Semiselective media of south Africa) และ TTC (Triphenyltetrazolium chloride media) ซึ่งสามารถเตรียมจากมันฝรั่งและสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น Peptone หรือ Polypeptone, $NH_4H_2PO_4$, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, Bromothymol blue วุ้นผง และอื่น ๆ เป็นต้น
8. เครื่องมือสำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียง หลอดทดลอง ธรรมดาและชนิดฝาเกลียว จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แอลกอฮอล์ 70 % เครื่องกรองและกระดาษกรองเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น
9. อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ สำหรับเก็บตัวอย่าง ทางโรคพืชวิทยา เช่น ขวดน้ำอัดลมขนาด 1 ลิตร, ถุง, มีด, กรรไกร, กล้องถ่ายรูป, แบบฟอร์มบันทึกตัวอย่าง, กระดาษเลเบวล์, ถังแช่เย็นสำหรับเก็บตัวอย่างโรค และตัวอย่างน้ำจากแปลงที่เป็นโรคเหี่ยว

วิธีการ

<u>การตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากน้ำในห้องปฏิบัติการ</u>

1. เลี้ยงเชื้อ *R. solanacearum* บนอาหาร PSA ที่ 28° ซ นาน 24-48 ชม. แล้วนำมาเตรียมเป็นสารละลายเชื้อความเข้มข้นที่ 10^8 cfu. ต่อ มล. โดยเทียบจากการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Hitachi 160.E) optical density = 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเจือจางเชื้อด้วยวิธี dilution serial ให้ได้สารละลายเชื้อที่ความเข้มข้น10^5,$10^4$$10^3$,$10^2$ และ 10 cfu. ต่อ มล เตรียมความเข้มข้นละ 10 มล นำไปตรวจหาเชื้อนี้ด้วยวิธี Indirect ELISA จากนั้นนำเชื้อทุกความเข้มข้นมาทดสอบวิธีการเตรียมเชื้อเพื่อให้ทราบว่าวิธีการใดที่เหมาะสมในการเตรียมเชื้อจากน้ำเพื่อการตรวจหาเชื้อดังกล่าวในสภาพที่มีการระบาดของโรค และวิธีใดจะมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อดังกล่าวได้ดีโดยทดลอง 3 กรรมวิธี ได้แก่

1.1 ใช้สารละลายเชื้อจากตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นโดยตรง

1.2 นำสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นมากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียจากนั้นนำกระดาษกรองมาตัดด้วยกรรไกรที่สะอาดแล้วละลายเซลแบคทีเรียที่ติดบนกระดาษกรองโดยแช่กระดาษกรองที่ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ1-2 มล แล้วปั่นหมุนด้วย vortex 5 นาที เพื่อให้เชื้อละลายอยู่ในน้ำ

1.3 ตกตะกอนเซลแบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ1 มล

จากนั้นแบ่งตัวอย่างที่ได้จากทั้ง 3 กรรมวิธี ไปตรวจหาปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี Indirect ELISA ตามที่ได้กล่าวโดยละเอียดข้างต้นแล้ว

2.นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากทั้ง 3 กรรมวิธี ตัวอย่างละ 250 ul ผสมกับอาหารจำเพาะ SMSA 750 ul ใน eppendrof tube ขนาด 1.5 มล แล้วเขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำมาตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี Indirect ELISA บน micro titer plate แล้วนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader

3.บันทึกผลและเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นต่าง ๆ ของเชื้อ *R. solanacearum* และเปรียบเทียบแต่ละกรรมวิธีต่าง ๆ ของการเตรียมเชื้อดังกล่าวเพื่อให้ทราบว่าวิธีการใดที่เหมาะสมในการเตรียมเชื้อจากน้ำเพื่อการตรวจหาเชื้อดังกล่าวและวิธีใดจะมีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อดังกล่าวได้ เพื่อนำไปปรับใช้กับการตรวจหาเชื้อในน้ำในสภาพแปลงต่อไป

<u>วิธีการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ด้วยวิธี Indirect ELISA</u>

ผสมสารละลายเชื้อ *R.solanacearum* ที่เตรียมไว้ตามคำอธิบายข้างต้นปริมาตร 4.5 มล. ด้วยสารละลาย coating buffer (carbonate buffer) ชนิด 10x ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดใส่ในหลุมของจานอีไลซ่าชนิดโพลีซอร์ปขนาด 96 หลุม โดยใส่ตัวอย่างละ 2 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้ 37° ซ นาน 4 ชม. หรือ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4° ซ จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T โดยใส่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม

และล้างด้วยเครื่องล้าง Mini washing Danatech laboratory Inc, USA ทำ 3 ครั้งแต่ละครั้งใช้เวลา 30 วินาที แล้วคว่ำเคาะจานอีไลซ่าบนกระดาษสะอาดหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นจะทำต่อหรือจะเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ ก็ได้ โดยนำมาทำกับชุดตรวจสอบแบบสำเร็จเรียกว่า ABC-kit เริ่มด้วยการบล็อกด้วย blocking buffer 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 60 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น จากนั้นใส่ primary antiserum (polyclonal antibody ที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง) ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเดียวกับที่ได้จากการหาค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม โดยใส่ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 1-2 ชม. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น แล้วใส่ secondary antiserum ซึ่งเป็น IgG conjugate with biotin ที่อยู่ในชุดสำเร็จปริมาตร 1 หยดต่อ PBS 15 มล. แล้วดูดปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 45 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร APH ที่อยู่ในชุดสำเร็จดังกล่าวปริมาตร 1 หยดต่อหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร ABTS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ หรือเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารในหลุมที่เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที ซึ่งสังเกตได้จากสีของกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS จากนั้นนำมาอ่านด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่าตั้งค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้มีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็น homologous immunogen ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นที่ใช้ฉีดเข้าสัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัมด้วยอัตราความเข้มข้นเดียวกับสารละลายเชื้อข้างต้น และมีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบเป็น น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ , carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer, BSA และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้แก่ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens, และ Xanthomonas camprestis* pv.*incoanae*

<u>การตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างน้ำในแปลงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว</u>

1.เก็บตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านแปลงปลูกมันฝรั่งที่มีโรคเหี่ยวระบาดในท้องที่ บ้านเจดีย์แม่ครัว บ้านแม่แฝกใหม่ อำเภอสันทราย และ บ้านสันต้นดู่ ต.เชื่อนแม่งัด อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ ได้ตัวอย่างน้ำมา 10 ตัวอย่าง ๆ ละ1 ลิตร

2.นำน้ำตัวอย่าง ๆ ละ 250 มล. มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลแบคทีเรียแล้วละลายตะกอนเซลด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1-2 มล จากนั้นแบ่งน้ำล้างตะกอน 250 ul ผสมกับอาหารจำเพาะ SMSA 750 ul ใน eppendrof tube ขนาด 1.5 มล แล้วเข่ยาบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 48 ชม.แล้วนำมาตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* โดยวิธี Indirect ELISA ด้วย micro titer plate แล้วน้ำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง ELISA reader บันทึกผลการตรวจปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาจากวิธีที่กล่าวข้างต้น

3. นำน้ำตัวอย่างจากข้อ 1 มาตรวจหาประชากรเชื้อ *R. solanacearum* ที่มีอยู่ในแต่ละตัวอย่าง โดยนำมาทำเจือจาง (dilution serial) ทุก10 เท่า ที่ 10^{-1},10^{-2},10^{-3},10^{-4},10^{-5} และ10^{-6}เท่า ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างของความเข้มข้นที่ 10^{-2},10^{-4}และ10^{-6}เท่า มาหาปริมาณเชื้อโดยทำ plate counting technique ด้วยการดูดสารละลายเชื้อในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 50 ul ใส่บนอาหาร SMSA ในจานเลี้ยงเชื้อแล้วกวาดเกลี่ยสารละลายเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร SMSA ด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม ทำความเข้มข้นละ 3 จาน แล้วเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 28° C นาน 3-5 วัน จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อแต่ละจานมาตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *R. solanacearum* เลือกจานที่มีโคโลนีระหว่าง 50-100 โคโลนี เพื่อคำนวณเป็นประชากรเชื้อ cfu ต่อ 1 มล ของตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแปลงที่มีการระบาดของโรค แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับการตรวจหาด้วยวิธีการ Indirect ELISA ของกรรมวิธีอื่น ๆ ดังกล่าวข้างต้น

เวลาและสถานที่ ตค. 2543 ถึง กย. 2546 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา, กลุ่มวิจัยโรคพืช, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากน้ำในห้องปฏิบัติการ</u>

จากการตรวจเชื้อ *R. solanacearum* ในน้ำที่ความเข้มข้น 10^5 $10^4$$10^3$$10^2$ และ 10 cfu ต่อ มล. ด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า 10^5 และ 10^4 ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกสามารถอ่านค่าได้ 0.587 และ 0.284 ตามลำดับ ขณะที่10^3, 10^2 และ 10 cfu ต่อ มล. ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ อ่านค่าได้ 0 ทุกความเข้มข้น แต่ถ้านำสารละลายเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงผ่านอาหาร SMSA แล้วจึงนำมาตรวจพบว่าทุกความเข้มข้นสามารถอ่านค่าได้เป็นบวกที่ 1.385, 1.121, 1.112, 1.212 และ 1.023 ตามลำดับ แต่ถ้านำสารละลายเชื้อดังกล่าวมาผ่านการกรองหรือผ่านการปั่นตกตะกอนเซลแล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA แล้วจึงมาตรวจพบว่าความเข้มข้นของเชื้อที่ผ่านการกรองหรือตกตะกอนเซลก่อนนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA จะให้ผลของปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาสูงกว่าการใช้สารละลายเชื้อโดยตรง ในขณะที่กรรมวิธีให้เชื้อผ่านการตกตะกอนเซลให้ผลของปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาสูงกว่ากรรมวิธีกรองเซล โดยกรรมวิธีตกตะกอนเซลให้ผลของปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา 2.584, 2.486, 2.348, 2.337 และ 2.078 ตามลำดับความเข้มข้นของเชื้อดังกล่าว ขณะที่กรรมวิธีกรองเซลอ่านค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาได้ 1.967, 1.769, 1.656, 1.388 และ 1.209 ตามลำดับความเข้มข้น (ตารางที่1) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำน้ำที่มีเชื้อ *R. solanacearum* ติดมามากรองหรือตกตะกอนเซลก่อนที่จะนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA จะสามารถตรวจหาเชื้อนี้ได้ดีกว่าการใช้สารละลายเชื้อโดยตรง โดยอ่านผลของปฏิกิริยาได้สูงกว่าการใช้น้ำที่มีเชื้อนี้ติดมาโดยตรง ในขณะที่กรรมวิธีตกตะกอนเซลด้วยเครื่องปั่นสามารถตรวจเชื้อดังกล่าวได้ดีกว่าการกรรมวิธีกรองเซล และกรรมวิธีตกตะกอนเซลก็สามารถทำได้สะดวกกว่าการกรองเซลเป็นอันมาก ดังนั้นจะได้นำกรรมวิธีตกตะกอนเซลด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงมาใช้ในการตรวจหาเชื้อดังกล่าวในสภาพธรรมชาติต่อไป

ตารางที่1 การตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ในน้ำด้วยวิธี Indirect ELISA หาค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของสารละลายเชื้อในแต่ละความเข้มข้นของเชื้อ, การเลี้ยงเชื้อในอาหาร SMSA และการตกตะกอนเชื้อจากน้ำ (แสดงค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร)

	1.769
	1.656
	1.388
	1.209
การตกตะกอนเชื้อก่อนเลี้ยงใน SMSA	
	2.584
	2.486
	2.348
	2.337
	2.078
กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ	
	0
	0
	0
	0
	0

<u>หมายเหตุ</u> กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ ได้แก่ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ , สารเคมีต่าง ๆ (carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer, BSA) และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefacian, และ Xanthomonas camprestis* pv.*incoanae*

การตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* จากตัวอย่างน้ำในแปลงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว

จากการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ในน้ำที่เก็บจากแปลงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวในเขตจังหวัดเชียงใหม่ โดยการเลี้ยงบนอาหาร SMSA พบว่ามีประชากรของเชื้อดังกล่าวอยู่ระหว่าง $1.29x10^2$ ถึง $1.42x10^3$ cfu ต่อ มล. และเมื่อนำน้ำดังกล่าวมาตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าน้ำจากทุกตัวอย่างให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ (OD=0) แต่เมื่อนำน้ำดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหาร SMSA นาน 48 ชม. แล้วตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าน้ำจากทุกตัวอย่างให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกด้วยค่าที่อ่านได้จากเครื่อง ELISA reader จากตัวอย่าง 1 ถึง 10 ดังนี้ 1.734, 1.489, 1.548, 1.878, 1.763, 1.683, 1.556, 1.408, 1.653 และ 1.667 ขณะที่น้ำที่ผ่านการตกตะกอนเซลแต่ไม่ได้เลี้ยงในอาหาร SMSA สามารถอ่านผลได้ 0.683, 0.775, 0.884, 0.596, 0.829, 0.664, 0.741, 0.588, 0.663 และ 0.675, ตามลำดับ สำหรับน้ำที่ผ่านการหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลแล้วนำตะกอนเซลมาเลี้ยงในอาหาร SMSA นาน 48 ชม. นำมาตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าน้ำจากทุกตัวอย่างให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกด้วยค่าที่อ่านได้จากเครื่อง ELISA reader จากตัวอย่าง 1 ถึง 10 ดังนี้ 2.356, 2.448, 2.886, 2.665, 2.469, 2.443, 2.556, 2.669, 2.598 และ 2.775 ตามลำดับ (ตารางที่2)

<u>ตารางที่2</u> การตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากน้ำในแปลงที่เป็นโรคเหี่ยวเขียวด้วยวิธี Indirect ELISA

ตัวอย่างน้ำจากแปลงมันฝรั่ง ที่เป็นโรคเหี่ยว ม.2 และ 4 อ. สันทราย จ.เชียงใหม่	ประชากรเชื้อ Rs.บนอาหาร TTC (cfu / ml)	น้ำจากแปลงที่เป็นโรคเหี่ยว ไม่ผ่านการปั่นตกตะกอน -SMSA	ไม่ผ่านการปั่นตกตะกอน +SMSA	ผ่านการปั่นตกตะกอน -SMSA	ผ่านการปั่นตกตะกอน +SMSA
1.	$1.32x10^3$	0	1.734	0.683	2.356
2.	$1.29x10^3$	0	1.489	0.775	2.448
3.	$1.38x10^3$	0	1.548	0.884	2.886
4.	$1.42x10^3$	0	1.878	0.596	2.665
5.	$1.33x10^3$	0	1.763	0.829	2.469
6.	$1.31x10^3$	0	1.683	0.664	2.443
7.	$1.34x10^3$	0	1.556	0.741	2.556
8.	$1.37x10^3$	0	1.408	0.588	2.669
9.	$1.39x10^3$	0	1.653	0.663	2.598
10.	$1.30x10^3$	0	1.667	1.556	0.675	2.775
กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวก (*R solanacearum*. 10^5 cfu/ ml.)	$1.03x10^5$	2.507		1.603	2.888
7.น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ(กรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบ)		0	0	0	0

การเก็บน้ำตัวอย่างจากแปลงปลูกมันฝรั่งที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวจากการตรวจหาประชากรเชื้อ *R.solanacearum* ด้วยวิธีการเลี้ยงบนอาหารกึ่งจำเพาะ SMSA พบว่าตัวอย่างน้ำทั้ง 10 ตัวอย่างมีประชากรของเชื้อ *R.solanacearum* อยู่ระหว่าง 1.29 – 1.42 x 10^3 cfu / ml และไม่สามารถตรวจพบเชื้อด้วยวิธี Indirect ELISA ได้ ในขณะที่ถ้านำน้ำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหาร SMSA ก่อนแล้วค่อยนำมาตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA จะสามารถตรวจหาเชื้อได้ แต่ถ้านำน้ำตัวอย่างมาผ่านการตกตะกอนเซลแล้วจึงนำไปเลี้ยงในอาหาร SMSA จะอ่านค่าปฏิกิริยาได้สูงกว่าและชัดเจนกว่าการใช้น้ำตัวอย่างโดยตรง ซึ่งค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่สูงนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาวิธีการตรวจจากการทำในห้องปฏิบัติการไปสู่การตรวจนอกห้องปฏิบัติการ โดยใช้แผ่น Nitrocellulose membrane ซึ่งสามารถค่าของปฏิกิริยาได้ด้วยตา ในขณะที่การใช้ microtiter plate จะต้องอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ELISA reader ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ไม่สามารถนำใช้งานในภาคสนามได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากทดสอบการตรวจหาเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่ความเข้มข้น 10^5,$10^4$$10^3$,$10^2$ และ 10 cfu. ต่อ มล ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่อ่านได้จากเครื่อง ELISA reader เป็นลบกับความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^3,10^2 และ 10 cfu. ต่อ มล ขณะที่ความเข้มข้น 10^5 และ 10^4 ได้ค่าปฏิกิริยาที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งมีค่า OD อยู่ระหว่าง 0.2-0.5 แต่ถ้านำสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าว มาเลี้ยงในอาหารเหลว SMSA แล้วนำอาหาร SMSA นี้มาตรวจด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาสูงขึ้นเป็นบวกกับทุกความเข้มข้นของเชื้อและอ่านค่าของปฏิกิริยาดังกล่าวได้ 1.112 - 1.385 และถ้านำสารละลายเชื้อดังกล่าวมากรองด้วยเครื่องกรองแบคทีเรียขนาด 0.2 ไมครอนหรือหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซล แล้วละลายตะกอนเซลด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจึงนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA จากนั้นนำมาตรวจหาเชื้อด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าวิธีหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อได้ดีกว่าการใช้สารละลายเชื้อโดยตรงและการกรองเชื้อด้วยกระดาษกรองแบคทีเรีย โดยวิธีหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลสามารถวัดค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาได้ 2.078 - 2.584 ซึ่งวิธีการนี้เมื่อนำไปใช้ตรวจหาเชื้อดังกล่าวจากตัวอย่างน้ำที่ไหลผ่านแปลงที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวในธรรมชาติก็พบว่าวิธีหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลก่อนนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA ดังกล่าวสามารถตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงโดยวัดค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาได้ 2.356 ถึง 2.886

การผลทดลองนี้ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะพอสังเขปคือ วิธีการตรวจหาเชื้อด้วยปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาแบบ Indirect ELISA โดยใช้ ELISA plate เป็นสิ่งรองรับมีข้อดีคือสามารถนำมาอ่านค่าผลของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ELISA reader ได้ค่าออกมาเป็นตัวเลข ซึ่งสามารถเปรียบเทียบค่าของปฏิกิริยากันได้ชัดเจน แต่ ELISA reader เป็นเครื่องมีที่มีราคาแพงจะมีใช้ในห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างพร้อมเท่านั้น ขณะที่วิธีการตรวจแบบ Indirect ELISA โดยใช้แผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) เป็นสิ่งรองรับสารที่ใช้ในการตรวจ วิธีการนี้จะอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยตาซึ่งมีข้อดีคือไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนมาก และการเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาก็กระทำได้ง่ายกว่าเพราะเป็นการประเมินด้วยสายตา ขณะที่การปั่นตกตะกอนเชื้อก่อนนำมาเลี้ยงในอาหาร SMSA สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ค่อนข้างชัดเจนมาก ดังนั้นในทางปฏิบัติของการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในน้ำซึ่งบางครั้งต้องออกไปทำในต่างจังหวัดที่ที่ซึ่งไม่สามารถที่จะหาเครื่อง ELISA reader ได้ ดังนั้นผู้วิจัยมีความเห็นว่าในการวิจัยต่อไปน่าจะพัฒนาวิธีการตรวจจากการใช้ ELISA plate มาเป็นแผ่น NCM แทน จะช่วยให้การปฏิบัติงานสะดวกและได้ผลดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล. 2535. การศึกษาความรุนแรงของเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง. รายงานประจำปี 2535. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 68-74.

_____. 2536. การศึกษาการเกิดโรคเหี่ยวจากบักเตรีของมันฝรั่งต่อพันธุ์มันฝรั่งบางพันธุ์. รายงานประจำปี 2536. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-108.

_____. 2537ก. การศึกษาชนิดของ biovars ของเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในประเทศไทย. รายงาน ประจำปี 2537. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กทม. หน้า 144-157.

_____. 2537ข. การศึกษาสารสกัดจากพืชตระกูลพลู พริกไทย ต่อการยับยั้งเชื้อบักเตรีสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในห้องปฏิบัติการ. รายงานประจำปี 2537. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. กทม. หน้า 128- 139”

_____. 2538. การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ *Pseudomonas solanacearum* สาเหตุโรค เหี่ยวของมันฝรั่งในประเทศไทย. รายงานประจำปี 2538. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรม วิชาการเกษตร กทม. หน้า

_____. 2541ก. โรคของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *ใน* มันฝรั่งและศัตรูที่สำคัญ เอกสารวิชาการฉบับที่ 22 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร บางเขน จัตุจักร กทม. หน้า 49-57.

_____. 2541ข. การตรวจหาเชื้อ*Pseudomonas solanacearum* ในหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานประจำปี 2538 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร กทม. หน้า 105-119.

French, E.R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of pottoes. In:Hayward, A.C. and G.L. Hartman (eds.). Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, U.K. 288 p.

French, E.R., L. Gutarra, and G. Vilchez. 1975. Field survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in Peru. European Association Potato Research VI Triennial Conference Papers. P. 96.

Martin, C. and E.R. French 2000. Bacterial wilt of potato Technical information Bulletin No.13. CIP Lima Peru.

ชีววิทยาและการเจริญเติบโตของกระชับ (*Xanthium Strumarium* L.)

Biology and Growth of Cochlebur

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์

กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ ได้ดำเนินงานในแปลงเกษตรกร อำเภอแกลง จังหวัดระยอง โดยนำเมล็ดกระชับที่จะปลูกไปแช่ในบ่อซีเมนต์ ที่มีการเปลี่ยนน้ำในบ่อทุกสัปดาห์ เพื่อกระตุ้นให้เมล็ดงอก แล้วนำเมล็ดที่เตรียมไว้ปลูกในแปลงเกษตรกร โดยปลูกเป็นแถวระยะระหว่างแถวและต้นเท่ากับ 50 x 50 เซนติเมตร หยอดหลุมละ 5 เมล็ด จำนวน 20 แถวๆ ละ 20 หลุม ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 3.5 กิโลกรัมต่อไร่ หลังจากปลูกแล้ว 1 เดือน บันทึกการเจริญเติบโตพบว่า เมล็ดกระชับเริ่มงอกหลังจากปลูก 3-4 วัน และเริ่มมีใบแท้เมื่ออายุต้นอ่อน 1 สัปดาห์ ลำต้นสูงเฉลี่ย 4.5 เซนติเมตร น้ำหนักแห้งเฉลี่ย 0.06 กรัม การเจริญทางลำต้นสูงสุดเมื่ออายุประมาณ 13 สัปดาห์ คือมีความสูงเฉลี่ย 90.5 เซนติเมตร จำนวนใบเฉลี่ย 143.8 ใบ จำนวนกิ่งหลักเฉลี่ย 10.5 กรัม น้ำหนักแห้งเฉลี่ย 49.2 กรัม การพัฒนาทางช่อดอกนั้น กระชับจะเริ่มออกดอกเมื่ออายุต้นประมาณ 9 สัปดาห์ เป็นช่อดอกแยกเพศ ช่อดอกตัวผู้จะเริ่มพัฒนาก่อนจะมีจำนวนมากกว่าดอกตัวเมีย การพัฒนาของช่อดอก จนกระทั่งเป็นผลแก่ ใช้เวลาประมาณ 6 สัปดาห์ และสามารถผลิตผลได้ 40-240 ผลต่อต้น หรือเฉลี่ย 100.1 ผลต่อต้น

คำนำ

กระชับ (*Xanthium strumarium* L.) เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae หรือเดิมอยู่ในวงศ์ Compositae มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดังนี้ ลำต้นตั้งตรงแตกกิ่ง มีขนสั้นๆ ปกคลุมสูง 30-150 เซนติเมตร เป็นพืชฤดูเดียว (Annual weed) ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงเวียนเป็นเกลียว แผ่นใบรูปไข่ฐานกว้างขอบใบเว้าลึก 3-5 หยัก ฐานใบเว้าคล้ายรูปหัวใจขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย ผิวใบทั้ง 2 ด้านมีขนปกคลุม ขนาดใบ 3-15 x 2.5-15 เซนติเมตร ก้านใบ 2-12 เซนติเมตร ช่อดอกเกิดที่ปลายกิ่งและซอกใบ เป็นดอกแยกเพศ ช่อดอกตัวผู้รูปทรงกลมมีดอกย่อยจำนวนมากอัดรวมกันแน่นเป็นกระจุก ช่อดอกตัวเมียอยู่ต่ำกว่าช่อดอกตัวผู้รูปทรงรี ประกอบด้วย 2 ดอกย่อย ไม่มีก้านช่อดอก ผลสีเขียว -น้ำตาลอ่อน มีหนามปกคลุม และปลายผลมีหนามโค้งแข็งยื่นออกมา 1 คู่ขนาดผล 20-22 x 8-9 เซนติเมตร (จันทร์เพ็ญ, 2541)

รหัสทะเบียนวิจัย 45 00003 29

กระชับ จัดเป็นวัชพืชหลังนาหรือหลังจากที่เกษตรกรเก็บเกี่ยวข้าวนาปีแล้ว เมื่อมีการเตรียมแปลงเพื่อปลูกพืชอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง หรือมะเขือเทศ ในแปลงหรือพื้นที่ที่มีเมล็ดกระชับสะสมอยู่ เมล็ดกระชับจะเริ่มงอก และเจริญเติบโตเป็นต้นแข่งขันกับพืชปลูก เนื่องจากกระชับแตกกิ่งก้านและมีใบขนาดใหญ่ จึงมีความสามารถในการแข่งขันได้ดี ทำให้การเจริญเติบของพืชปลูกลดลง มีรายงานว่า ในแปลงที่มีต้นกระชับระบาดนาน 4-6 สัปดาห์ จะทำให้ผลผลิตของถั่วเหลืองลดลง 10-80% นอกจากนี้ยังให้สารธรรมชาติซึ่งมีคุณสมบัติของสารอลิโลพาธิค ซึ่งเป็นสารอันตราย หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชบางชนิดอีกด้วย (Bozsa and Oliver, 1993)

อีกมุมมองหนึ่งของต้นกระชับนั้น ก็ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยใช้เป็นผักพื้นบ้าน เนื่องจากหลายท้องที่ในอำเภอแกลง จังหวัดระยอง ชาวบ้านนิยมบริโภคต้นอ่อนของกระชับ คล้ายต้นถั่วงอก แต่มีขนาดโตกว่า คือ ใบเลี้ยงมีสีเขียวอ่อน ต้นสูงประมาณ 7-10 เซนติเมตร ราคาที่ซื้อขายกันในท้องตลาดประมาณ 50-80 บาทต่อกิโลกรัม ขึ้นอยู่กับฤดูกาล อาหารที่ปรุงจากต้นกระชับที่นิยมกันคือ แกงส้ม และรับประทานสด หรือลวกจิ้มน้ำพริก หรือจะผัดน้ำมันหอยก็ได้ ซึ่งกรมส่งเสริมการเกษตรได้ส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก เพื่อเป็นผักพื้นบ้าน และสามารถเป็นรายได้ของเกษตรกรอีกทางหนึ่ง

อย่างไรก็ตาม ความนิยมในการบริโภคนั้นก็ขึ้นอยู่กับแต่ละท้องที่ บางพื้นที่ไม่นิยมบริโภค กระชับก็จะถูกจัดให้เป็นวัชพืชที่ไม่ต้องการให้มีอยู่ในแปลง ดังนั้นจึงเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ควรให้ความสนใจ และศึกษาข้อมูลต่างๆ ทางด้านชีววิทยา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการจัดการในพื้นที่เกิดปัญหา หรือการนำมาใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ยังเป็นข้อมูลประกอบการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช เพื่อการส่งออกสินค้าเกษตรอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

ดำเนินการศึกษาที่แปลงเกษตรกร อำเภอแกลง จังหวัดระยอง โดยเก็บเมล็ดกระชับในแปลงเกษตรกรเมื่อเดือน เมษายน 2546 ผึ่งให้แห้งประมาณ 1 เดือน แล้วจึงนำเมล็ดกระชับไปเก็บไว้ในน้ำ เพื่อให้เมล็ดไม่ฝ่อ หรือเสียหายไปก่อนที่จะปลูกตามฤดูกาล การเก็บเมล็ดในน้ำนั้นก็เป็นการเลียนแบบธรรมชาติ คือ เมล็ดกระชับจะถูกไถกลบในดิน หลังจากชาวนาเตรียมแปลง และเอาน้ำเข้าแปลงเมล็ดกระชับจะจมอยู่ใต้ดิน ซึ่งเป็นระยะฟักตัวของเมล็ด การศึกษาครั้งนี้จึงได้นำเมล็ดที่แช่น้ำไว้ไปปลูกในเดือนพฤศจิกายน โดยหยอดเมล็ดในหลุม ๆ ละประมาณ 5 เมล็ด ปลูกเป็นแถวระยะระหว่างแถวกับหลุมคือ 50x50 เซนติเมตร แปลงที่ศึกษานี้จะปลูกกระชับ 20 แถวๆ ละ 20 ต้น ระยะเวลาดำเนินงานตั้งแต่ตุลาคม 2546 ถึงเดือนพฤษภาคม 2547 หยอดปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 35 กิโลกรัมต่อไร่ หลังจากปลูกแล้วประมาณ 1 เดือน

วิธีการดำเนินการศึกษา ได้สุ่มตัวอย่างต้นกระชับเพื่อติดตามบันทึกการเจริญเติบโตและพัฒนาการ โดยการปักป้ายจำนวน 20 ต้น และเริ่มบันทึกข้อมูลตั้งแต่เมล็ดกระชับเริ่มงอก โดยการวัดขนาดใบ นับจำนวนใบ ขนาดความสูง และการแตกกิ่ง บันทึกช่วงเวลาการออกดอก และพัฒนาการของดอก และเก็บต้นจากแปลง เพื่อบันทึกน้ำหนักสด และแห้งครั้งละ 20 ต้นเช่นกัน ระยะเวลาการบันทึกข้อมูล โดยเริ่มจากเมล็ด

งอกในสัปดาห์ที่ 1 และบันทึกข้อมูลทุก 2 สัปดาห์กล่าวคือเมื่ออายุต้นได้ 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 17 และ 19 สัปดาห์

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

เมล็ดกระชับที่ผ่านการแช่น้ำเป็นเวลานานหลายเดือน จะเป็นช่วงที่ได้ผ่านการฟักตัวแล้ว เมื่อนำมาปลูกก็จะเริ่มงอกหลังจากหยอดเมล็ดได้ 3-4 วัน จะเริ่มมีราก และเกิดลำต้นมีใบเลี้ยง 2 ใบ ลักษณะใบเลี้ยงจะเป็นทรงกลมรี ปลายใบและฐานเรียงแคบกว่าส่วนกลางใบขนาด 0.9-3.6 เซนติเมตร เป็นการงอกแบบ epigeal germination คือ ส่วนของ hypocotyl จะยืดตัวมีลักษณะโค้งงอดึงเอาส่วนของใบเลี้ยงโผล่ขึ้นมาเหนือดิน ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะของใบเลี้ยงคู่โดยทั่วไป (พรชัย, 2540) อายุประมาณ 1 สัปดาห์ มีใบแท้ 1 คู่ ลำต้นสูงเฉลี่ย 4.5 เซนติเมตร ความสูงจะเพิ่มขึ้นตามอายุ เมื่ออายุเพิ่มเป็น 5, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 17 และ 19 สัปดาห์ ลำต้นมีความสูงเฉลี่ย 23.6, 37.7, 56.1, 77.6, 90.5, 91.5 และ 89.0 เซนติเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตทางลำต้นสูงสุดอยู่ที่ช่วง 13 สัปดาห์หลังจากเมล็ดงอก

การแตกกิ่งจากลำต้น การแตกกิ่งนั้นจะเริ่มเมื่อต้นกระชับมีอายุประมาณ 4-5 สัปดาห์ มีจำนวนกิ่งเฉลี่ย 3.9 และจำนวนกิ่งจะเพิ่มเป็น 6.2, 7.8, 9.5, 10.5, 11.9, 11.0 และ 10.5 เมื่ออายุของต้นเพิ่มเป็น 7, 9, 11, 13, 15, 17 และ 19 สัปดาห์ตามลำดับ (ตารางที่ 1) การแตกกิ่งที่มีลักษณะเช่นเดียวกับความสูงของลำต้น คือจะมีการเจริญสูงสุดในช่วง 13 สัปดาห์หลังจากเมล็ดงอกแต่การพัฒนาขนาดของใบนั้นพบว่า เมื่ออายุต้นได้ประมาณ 7 สัปดาห์ ใบจะมีขนาดใหญ่ที่สุด คือ มีความกว้างและยาวเฉลี่ย 10.1x8.7 เซนติเมตร

ดังนั้น จึงจะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของกระชับในช่วง 7 สัปดาห์หลังจากเมล็ดงอกนี้ จะเป็นช่วงที่มีการแตกกิ่งมากและใบมีขนาดโตเต็มที่ และเป็นระยะแข่งขันกับพืชปลูกได้ดี โดยเฉพาะใบที่กว้างใหญ่จะเบียดบังแสงแดด หรือทำให้เกิดร่มเงา ซึ่งจะเป็นผลเสียต่อพืชปลูกในแปลง ดังนั้นการป้องกันกำจัดจึงควรเริ่มดำเนินการก่อน ช่วงนี้คือก่อนที่ใบจะโตเต็มที่ เช่นเดียวกันกับการกำจัดสาบแร้งสาบกาในแปลงมะเขือเทศ ที่ควรกระทำในช่วง 2-6 สัปดาห์ จะทำให้ได้ผลผลิตสูงที่สุด (เสริมศิริ, 2529)

การสะสมน้ำหนักแห้งจะเพิ่มขึ้นจาก 0.06 กรัม/ต้น เมื่ออายุได้ 1 สัปดาห์ เป็น 0.3, 1.1, 5.2, 16.6, 28.6, 49.2, 73.6, 75 และ 75 กรัมต่อต้น เมื่ออายุของต้นเพิ่มเป็น 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 และ 19 สัปดาห์ การสะสมน้ำหนักแห้งจะสูงสุดในสัปดาห์ที่ 15 หลังจากเมล็ดงอก (ตารางที่ 1)

การเจริญเติบโตได้ในวงจรชีวิตของต้นกระชับนั้น มีลักษณะเช่นเดียวกับพืชอื่นๆ คือ แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ นับตั้งแต่ต้นเริ่มงอกจากเมล็ดจนกระทั่งเริ่มออกดอก ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่นับว่ามีความสำคัญมาก เพราะเป็นช่วงที่พืชต้องการปัจจัยต่างๆ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นช่วงที่มีการแข่งขันกับพืชปลูกสูงสุด (พรชัย, 2540) ส่วนอีกระยะเป็นการเจริญเติบโตทางด้านการพัฒนาการของดอกและผล ก็นับว่าเป็นระยะที่สำคัญเช่นกัน เพราะจะเป็นส่วนที่ช่วยแพร่กระจายพันธุ์ สำหรับกระชับนั้นจะเริ่มออกดอกเมื่ออายุได้ประมาณ 9 สัปดาห์ ดอกจะเริ่มพัฒนาที่ปลายยอดของลำต้น และตามซอกใบ ดังนั้นต้นที่มีการเจริญแตกกิ่งก้านมากย่อมจะให้ผลผลิตมากตามไปด้วย ดังนั้นปริมาณช่อดอกขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของลำต้น และสามารถออกดอกไปตั้งแต่อายุ 9 สัปดาห์ถึง 13 สัปดาห์ ระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาจนได้ผลแก่ในใช้เวลาประมาณ 6 สัปดาห์ภายในผลดังกล่าวจะมี 2 เมล็ด ซึ่งพืชในสกุลนี้เรียกว่า achene คือผลที่มีเปลือกบางแห้งและเหนียวแต่ไม่ได้หลอมรวมกับเปลือกเมล็ด เมื่อผลแก่ไม่แตกมีเพียง 1 เมล็ด บางครั้งเรียกผลว่าเมล็ด (วิยดา, 2523) มีรูปทรงยาวรีที่ปลายด้านหนึ่งมีหนาม 1 คู่ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ขนาดของเมล็ด 20-22 x 8-9 มิลลิเมตร ต้นกระชับสามารถผลิตเมล็ดได้ผล 40-240 ผลต่อต้น หรือมีค่าเฉลี่ย 100.1 ผลต่อต้น ผลที่แก่จัดจะมีสีน้ำตาล เกษตรกรที่จะเก็บผลเพื่อนำไปเพาะเป็นต้นอ่อนได้นั้นจะเริ่มทยอยเก็บผลตั้งแต่ปลายเดือนมีนาคม หรืออายุต้นได้ประมาณ 17 สัปดาห์ มิฉะนั้นผลที่แก่ก่อนจะร่วงหมด และเก็บเกี่ยวสุดท้ายช่วงประมาณกลางเดือนเมษายน

สำหรับท้องที่อื่นๆ ที่ไม่นิยมบริโภคต้นกระชับนั้น ผลกระชับก็จะร่วงหล่น และสะสมในดินมีการฟักตัวตามธรรมชาติ เมื่อถึงฤดูทำนาผลก็จะแช่อยู่ในน้ำ และเมื่อหมดฤดูทำนา หรือเมื่อเก็บเกี่ยวข้าวแล้ว มีการไถพรวนดินเพื่อเตรียมปลูกพืชอื่นๆ ผลกระชับก็จะเริ่มงอกเจริญเติบโตแข่งกับพืชอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากแต่ละผลของกระชับจะมี 2 เมล็ด ดังนั้นจึงมักพบว่าแต่ละผลจะงอก 2 ต้น

การศึกษาในครั้งนี้ตลอดฤดูจะไม่มีการให้น้ำ และเป็นช่วงฤดูแล้งไม่มีน้ำฝน กระชับอาศัยแต่ความชื้นในดินในการเจริญเติบโต ดังนั้นขนาดของต้นจึงไม่เจริญเติบโตเข้ากับในพื้นที่ที่การให้น้ำและปุ๋ยตามแปลงปลูกพืชต่างๆ

สรุปผลการศึกษา

1. การเจริญเติบโตทางลำต้น เมล็ดกระชับจะเริ่มงอกหลังจากหยอดเมล็ดในแปลง 3-4 วัน และเริ่มแตกกิ่งก้านเมื่ออายุต้นได้ประมาณ 5 สัปดาห์ และการเพิ่มขนาดความสูงและจำนวนใบมากที่สุดเมื่ออายุต้นได้ 13 สัปดาห์

2. การเจริญช่วงออกดอก กระชับจะเริ่มออกดอกเมื่ออายุได้ประมาณ 9 สัปดาห์ ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกจนได้ผลแก่ใช้เวลาประมาณ 6 สัปดาห์ หรืออายุต้นประมาณ 15 สัปดาห์ และสามารถผลิตผลได้เฉลี่ย 100.1 ผลต่อต้น แต่ละผลจะมี 2 เมล็ด ดังนั้นจึงมักพบว่าเมื่อนำผลกระชับไปเพาะมักจะได้ต้นกระชับ 2 ต้น

เอกสารอ้างอิง

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ 2541. กระชับ. ข่าวพฤกษศาสตร์และวัชพืช. ปีที่ 10 ฉบับที่ 1 7-8 หน้า.

เสริมศิริ คงแสงดาว เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์ ชำนาญ ทองกลัด สมถวิล ศศิผลิน และสงคราม ธรรมจารี. 2529. การควบคุมกำจัดวัชพืชในมะเขือเทศ รายงานผลการค้นคว้าวิจัย ปี 2529. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 482-498

วิยดา เทพหัตถ์ถี. 2523.พจนานุกรมศัพท์พฤกษศาตร์ สาขา พฤกษศาสตร์ อนุกรมวิธาน คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร. 206 หน้า.

Bozza, R.C. Oliver. 1993. Shoot and root interference of common cocklebur (*Xanthium strumarium* and soybean (Glycine Max). Weed Science 41 : 34-37.

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความสูง จำนวนใบและกิ่ง ขนาดใบ น้ำหนักแห้ง และผลผลิตของต้นกระชับ

สัปดาห์หลังจากเมล็ดงอก	ความสูง (ซม.)	จำนวนใบ	จำนวนกิ่ง	ขนาดใบ (ซม.)		ผล/ต้น	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
				กว้าง	ยาว		
1	4.5	2.0	-	0.9	3.6	-	0.6
3	10.7	4.3	-	3.1	3.8	-	0.3
5	23.6	15.7	3.9	8.0	7.5	-	1.1
7	37.7	30.1	6.2	10.1	8.7	-	5.2
9	56.1	55.8	7.8	9.9	8.9	-	16.6
11	77.0	82.6	9.5	9.5	8.5	5.6	28.6
13	90.5	143.8	10.5	9.3	8.3	80.3	49.2
15	91.5	*	11.9	*	*	100.1	73.6
17	90.2	*	11.0	*	*	99.8	75.0
19	89.0	*	10.5	*	*	96.1	75.0

* ใบเริ่มเหลือง และร่วง

ตัวเลขในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจำนวน 20 ต้น

การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* สาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศ

Antiserum for Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* The Causal Agent of Bacterial spot on Tomato

ณัฏฐพร อุทัยมงคล **ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล** [1/]
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ไอโซเลท No.260 ที่แยกจากมะเขือเทศ ที่เก็บจากอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งเป็นไอโซเลทรุนแรงที่สุด โดยสามารถทำให้มะเขือเทศเป็นโรคได้ภายใน 5 วัน หลังการปลูกเชื้อ การผลิตแอนติซีรัมโดยใช้วิธีการ Glutaraldehyde fixed cell จากแบคทีเรีย 10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดกระต่าย 4 ครั้ง ห่างกันทุกสัปดาห์ นำแอนติซีรัมที่ได้ไปหาค่า titer โดยวิธี ELISA และ DIBA พบว่าแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 2, 3 และ 4 ได้ค่า titer สูงสุดคือ 1: 20,000 และเมื่อนำแอนติซีรัมไปหา ความไวจำเพาะ พบว่ามีความไวจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยวิธี ELISA และ DIBA และจากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของแอนติซีรัม พบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ทุกไอโซเลท แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri, X. campestris* pv. *campestris, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* pv. *carotovora* และ *Pseudomonas solanacearum* รวม 10 ไอโซเลท แสดงว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* เท่านั้น โดยที่มีประสิทธิภาพตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จากเมล็ดมะเขือเทศต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรและให้ผลของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับแอนติซีรัมที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 04005 009

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

The antiserum for detecting *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* was produced from *X. campestris* pv. *vesicatioria* isolate NO. 260 collected from tomato plant at Amphur Pak Chong, Nakhon Ratchasima Province. This isolate was the most isolate which caused the severe symptom on tomato plant within 5 days after inoculation. The Glutaraldehyde fixed cell techniques and followed by subcutaneous injection into a white rabbit using 10^9 colony forming unit/ml (cfu/ml) of the bacterial suspension for 4 times at weekly interval. First antiserum was bled at one week after the last injection and continuing collected for 3 times at one week interval. The experiment results indicated that the highest titer of antiserum, collected, was 1: 20,000 from the second to the forth bleed using ELISA and DIBA techniques. The sensitivity of antiserum was reacted to 10^4 cfu/ml of bacterial suspension and the produced antiserum was specific against all the isolates of *X. campestris* pv. *vesicatoria* but had no reaction to the other species of tested bacteria

คำนำ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* L.) เป็นพืชผักที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae ที่ปลูกกันมากในหลายประเทศทั้งแถบเอเชีย ยุโรป และอเมริกาใต้ เพื่อการบริโภคผลสดภายในประเทศหรือเพื่อการส่งออก สำหรับประเทศไทยมีแหล่งปลูกอยู่ในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แบ่งเป็น 2 รูปแบบ คือ เพื่อบริโภคผลสด และเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ การผลิตทั้ง 2 รูปแบบต้องมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากต่างประเทศ หรือใช้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตภายในประเทศ การนำเข้าจากต่างประเทศจะมาจากหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส ฮอลแลนด์ ญี่ปุ่น เป็นต้น (ตารางที่ 1) ในทางตรงกันข้าม ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการส่งออกเมล็ดพันธุ์ไปจำหน่ายยังต่างประเทศเช่นกัน ประเทศผู้ซื้อได้แก่ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ อิตาลี ญี่ปุ่น อิสราเอล สเปน อัฟริกาใต้ เป็นต้น

ศัตรูพืชที่สำคัญของมะเขือเทศได้แก่ โรคและแมลง โรคที่สำคัญและพบมากในทุกแหล่งปลูก คือ โรคใบจุด (Bacterial spot) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* และสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Seed borne) ทำให้เชื้อแพร่ระบาดไปกับเมล็ด เชื้อนี้มีพืชอาศัยกว้าง เช่น พริก มะเขือม่วง และวัชพืชหลายๆ ชนิด เมล็ดพันธุ์ส่งออกไปยังต่างประเทศเกือบทุกประเทศที่เป็นคู่ค้าจะกำหนดให้ประเทศไทยต้องมีการตรวจสอบและรับรองว่าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวต้องปราศจากแบคทีเรียชนิดนี้ โดยอาจเป็นการรับรองในรูปของเมล็ดพันธุ์ หรือรับรองในช่วงระยะการเจริญเติบโตในแปลงปลูก (ตามตารางที่ 2 ก, ข)

การตรวจสอบโรคใบจุดนี้สามารถตรวจสอบจากเมล็ดพันธุ์ หรือจากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการ การจำแนกเชื้อสาเหตุอาจใช้วิธีการทางสรีรวิทยา , สัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งต้องใช้เวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ หรือใช้ วิธี ELISA โดยต้องสั่งซื้อแอนติซีรัมจากต่างประเทศในราคาแพง แต่วิธีทางเซรุ่มวิทยาเป็นวิธีการหนึ่งที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ (Civerolo and Fan, 1982) ดังนั้นการผลิตแอนติซีรัมจากเชื้อแบคทีเรียที่พบในประเทศไทย จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพราะมีความเฉพาะเจาะจงสูงกับเชื้อที่ปรากฏในประเทศไทย รวมทั้งยังลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อจากต่างประเทศอีกด้วย

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ จึงเป็นการทดสอบสารแอนติซีรัมจากเชื้อแบคทีเรียในประเทศ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคใบจุดของมะเขือเทศได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการโรค ที่เห็นเป็นจุดฉ่ำน้ำ ที่ใบ กิ่ง ลำต้น หรือผล ใส่ในถุงพลาสติกพร้อมทั้งบันทึกรายละเอียดอาการโรคและสถานที่เก็บ

วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรีย

แยกเชื้อแบคทีเรียจากส่วนของพืชที่แสดงอาการจุดฉ่ำน้ำ โดยตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ระหว่างส่วนที่เป็นโรคและส่วนที่ไม่เป็นโรค ชิ้นส่วนนี้นำมาแช่ในสารละลาย 0.1%โซเดียมไฮโปครอไลด์ นาน 1 นาที จากนั้นล้างตามด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แยกตัวอย่างพืชออกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งนำชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.5 กรัมใส่ในหลอดแก้วที่มีน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% ปริมาณ 1 มิลลิลิตรใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วบดให้ละเอียด แล้วตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปเลี้ยงเชื้อโดยการ steak plate บนอาหาร Nutruient agar (NA) ส่วนที่สองโดยวางชิ้นพืชที่ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อบนอาหาร NA นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองส่วนไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ28องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เก็บโคโลนีที่มีสีเขียวอมเหลืองไป steak ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร NA อีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเก็บเชื้อในหลอดอาหารเอียง NA เพื่อทำการทดสอบ ต่อไป

วิธีทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บไว้หลอดอาหารเอียง NA มาเลี้ยงเชื้อขยายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารละลายเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^{8} -10^{9} โคโลนี/มิลลิลิตร นำมามาปลูกเชื้อโดยการพ่นเชื้อแบคทีเรียบนใบของมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 2สัปดาห์ ให้คลุมต้นมะเขือเทศด้วยถุงพลาสติกนาน 2 วัน เปิดถุงออกสังเกตุอาการโรค และให้ใช้น้ำกลั่นนึ่งฉีดพ่นแทนเชื้อแบคทีเรีย เป็นตัวเปรียบเทียบ (check)

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

ทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรียตามลักษณะทาง สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และปฏิกิริยาชีวเคมีที่ปรากฏในหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition 1994 และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria., Shaad. (2001) และตามวิธีการของ Dye (1960,1962) Lawrence (1967) รวมทั้งใช้ ELISA ของAgdia kit ตรวจสอบอีกครั้งหนึ่ง

การเตรียมแอนติเจน

นำเชื้อแบคทีเรีย*X. campestris* pv. *vesicatoria* No.260 ที่จำแนกชนิดและทดสอบความรุนแรงโรคแล้วมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA (Potato semi-synthetic agar) ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาล้างเซลล์แบคทีเรีย 3 ครั้งด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Allan and Kelman, 1977) แล้วนำไป

ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifugue) ที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำเซลล์แบคทีเรียที่ล้างแล้วมาละลายใน PBSจากนั้นนำไปทำการ fix เซลล์แบคทีเรียด้วย 2% glutaraldehydeเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Allan and Kelman, 1977) นำมาทำให้ glutaraldehyde เจือจางหมดไปโดยการ dialysis ใน PBS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยเปลี่ยน PBS ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เก็บสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการฉีดกระต่ายต่อไป

การผลิตแอนติซีรัม

ทำการละลายเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการ fix เซลล์ด้วย glutaraldehyde แล้วปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี ต่อมิลลิลิตร ด้วย PBS จากนั้นนำไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ในอัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันเพื่อนำไปฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand สีขาว โดยก่อนการฉีด 1 สัปดาห์ เจาะเก็บเลือดกระต่ายไว้ก่อนเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (Normal serum) จากนั้นนำสารละลายแบคทีเรียที่ผสมกับ adjuvant แล้วฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่าย โดยฉีดอาทิตย์ละหนึ่งครั้ง รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 4 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 1 อาทิตย์ เจาะเก็บเลือดกระต่าย 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แยกและเก็บแอนติซีรัม โดยนำเลือดกระต่ายที่ได้ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เม็ดเลือดแดงแข็งตัว จากนั้นใช้เข็มลนไฟฆ่าเชื้อ กรีดที่ผิวตรงรอยต่อระหว่างบีกเกอร์กับเลือดจนรอบ นำบีกเกอร์ไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อเอาส่วนเม็ดเลือดแดงออกไป นำส่วนน้ำใสที่ได้ซึ่งเป็นแอนติซีรัมเก็บแช่แข็งไว้

การหาค่า titerและความไวจำเพาะ(Sensitivty) ของแอนติซีรัม

ทำได้ได้โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Clark, 1981; Civerolo and Fan, 1982:) และวิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) (Hamplton *et al.,*1990)

การเตรียมแบคทีเรีย *X.campestris* pv. *vesicatoria* โดยนำเซลล์แบคทีเรีย *X.campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 ที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง PSA อายุ 24-48 ชั่วโมง มาละลายโดยใช้ PBS ปรับค่า optical density (OD)ที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.1 ซึ่งจะมีความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร นำมาทำ serial dilution โดยใช้สารละลาย PBS หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ให้มีความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2 และ 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตรตามลำดับ เตรียมไว้สำหรับใช้ทดสอบหาค่าtiterและความไวจำเพาะ(Sensitivty) โดยวิธีELISA และDIBA

การเตรียมแอนติซีรัม การเตรียมแอนติซีรัมสำหรับทดสอบโดยวิธี ELISA ให้นำแอนติซีรัมที่ได้จากการสกัดข้างต้น มาทำให้เจือจางด้วย Conjugate buffer (2.0 กรัม Polyvinyl Pyrrolidone,5.0 กรัม Bovine Serum albumin) สำหรับวิธีทดสอบด้วย DIBAให้เจือจางด้วย Blocking buffer (Tris buffer saline (50 mM Tris,150 mM Nacl ,ph 7.4) เติมด้วย 5% skim milk โดยทั้งสองวิธีจะเตรียมให้แอนติซีรัมเจือจาง

ตั้งแต่ 1:100,1:500,1:5000,1:10,000,1:15,000,1:20,000,1:25,000,1:30,000,1:35,000และ1:40,000 ตามลำดับ เตรียมไว้สำหรับใช้ทดสอบหาค่า titer และความไวจำเพาะ (Sensitivity) ต่อไป

วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) นำสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ ใส่ลงในหลุมของ microtiter plate โดยใส่หลุมละ 50 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เชื้อติดหลุม ทำการล้าง plate ด้วยสารละลาย BPS ที่ผสม 0.5 มิลลิลิตรของ Tween 20 (PBST) จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที หยอด antiserum ที่เจือจาง 1:100 ถึง 1:40,000 ด้วย conjugate buffer จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม และ มี normal serum ที่เก็บไว้ตอนแรกเป็นตัวเปรียบเทียบ นำ plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนำออกมาและล้าง plate ด้วย PBST จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดด้วย P-nitrophenyl phosphate ที่ละลายใน substrate buffer ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เพื่อปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย 3M. Sodium hydroxide หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาของแต่ละความเข้มข้นของ antiserum โดยปฏิกิริยาที่ให้ผลบวก (positive) จะปรากฏเป็นสีเหลืองซึ่งเป็นผลการย่อย p-nitophenyl phosphate ส่วนปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ (negative) ไม่เกิดสี นำ plate การเกิดปฏิกิริยาที่ได้ไปอ่านค่าอีกครั้งหนึ่งโดยการใช้เครื่องอ่าน (ELISA READER) ที่ใช้ค่าการดูดซับคลื่นที่ 405 นาโนเมตร ค่าของปฏิกิริยาบวกจะต้องมีค่ามากกว่า negative control 1.5 เท่า

วิธี Dot Immunobinding assay (DIBA) นำสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้และมี nomal serum ที่เก็บไว้เป็นตัวเปรียบเทียบ จำนวน 10 ไมโครลิตร นำมาหยดลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโรส (Nitrocellulose membrane ขนาด 0.45 ไมครอน) ที่ขีดเป็นตารางด้วยดินสอดำขนาด 1x1 เซนติเมตร ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง 2 จุดต่อความเข้มข้น ทำจำนวน 11 แผ่น เท่าจำนวนแอนติซีรัมที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ นำกระดาษไนโตรเซลลูโรสที่หยดสารละลายเชื้อแล้วแต่ละแผ่น นำไปแช่ใน Blocking buffer นาน 5 นาทีบน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ล้างกระดาษไนโตรเซลลูโรสใน TBST (TBS 1 ลิตร มี Tween 20 ผสมอยู่ 0.5 มล.) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ใน แอนติซีรัมที่เตรียมให้เจือจางที่ 1 : 100 ใช้หนึ่งแผ่นต่อหนึ่งความเข้มข้นจนครบ 1:40,000 นาน 1 ชั่วโมง บน rotary shaker ที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที แล้วล้างอีก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ด้วย TBST นำกระดาษไนโตรเซลลูโรสแช่ใน Blocking buffer ที่เติมด้วย Goat-anti-Rabbit ติดฉลากด้วยเอนไซม์บ่งชี้ alkaline phosphatase (Sigma A-8025) ที่ความเข้มข้น 1:1,000 นาน 1 ชั่วโมงบน rotary shaker ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที ล้างกระดาษไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST อีก 3 ครั้ง ใน TBS pH 9.6 เป็นเวลา 5 นาที เพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ก่อนแช่ลงใน substrate buffer โดยเตรียมจาก 0.1 มิลลิลิตรของสารละลาย 5-bromo-4-chloroindoxyl phosphate ใน dimethyl formamide ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรของสารละลาย Nitro Blue tetrazolium ใน 95% ethanol ความเข้มข้น 1

มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 20 ไมโครลิตรของ 2M $MgCl_2$ และ 9 มิลลิลิตรของ TBS pH 9.6 ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องบน rotary shaker ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ปฏิกิริยาบวกจะเกิดจุดสีม่วงน้ำเงินขึ้น ส่วนปฏิกิริยาที่ให้ผลลบ (negative) ไม่เกิดสี

การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม (Specificity of antiserum) กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ

ทดสอบโดยวิธี ELISA ทำการทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมกับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ จำนวน 14 ไอโซเลท ดังนี้ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* จำนวน 4 ไอโซเลท , *X. campestris* pv. *citri* จำนวน 2 ไอโซเลท *X. campestris* pv. *campestris* จำนวน 2 ไอโซเลท *X. oryzae* pv. *oryzae* จำนวน 2 ไอโซเลท *Erwinia carotovora* pv. *carotovora* จำนวน 2 ไอโซเลท *Pseudomonas solanacearum* จำนวน 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 6)โดยนำเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ นี้มาเลี้ยงบนอาหาร PSAให้มีอายุ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาละลายด้วย PBS ให้ได้ค่า OD = 0.1 ที่ 600 นาโนเมตร นำสารละลายของเชื้อแต่ละชนิดมาหยดในหลุมๆละ 50 ไมโครลิตร ของ microtiter plate วางไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทำตามวิธี ELISA ดังที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว โดยใช้แอนติซีรัมในอัตราส่วน 1:1,000(ตามคำแนะนำในฉลากของGoat-antirabbit) จากนั้นทำการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

การทดสอบประสิทธิภาพแอนติซีรัมที่ผลิตได้และแอนติซีรัมที่ซื้อ

โดยการนำสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 10-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ที่เตรียมตามวิธีที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว นำสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้นมาหยดในหลุมๆละ 100 ไมโครลิตร ของ microplate จำนวน 2 หลุมต่อความเข้มข้นของเชื้อ วางไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาทำตามวิธี ELISA ดังที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว ทำการทดสอบเปรียบเทียบการใช้แอนติซีรัมที่ผลิตในอัตราส่วน 1: 1000 ทดสอบเปรียบเทียบกับ แอนติซีรัม ที่สั่งซื้อจากต่างประเทศคือ บริษัท Agdia จากสหรัฐอเมริกา ใช้อัตราตามฉลากแนะนำ1:1,000เปรียบเทียบปฏิกิริยาที่ได้

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิต กับเมล็ดมะเขือเทศ

ใช้เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ไม่เป็นโรคจำนวน สายพันธุ์ละ 100 เมล็ดลงไปแช่ในสารละลายเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 10-10^8 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตรที่เตรียมตามวิธีที่อธิบายไว้ข้างต้นแล้ว นาน 15-20 นาที นำเมล็ดมะเขือเทศขึ้นผึ่งให้แห้งแล้วเก็บไว้ทดสอบ โดยการนำเอาเมล็ดมะเขือเทศแต่ละความเข้มเข้นออกมาแช่ใน PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นาน 15 นาที นำสารละลายที่ได้ของแต่ละความเข้มข้นไปตรวจสอบโดยวิธี ELISA และ DIBA โดยใช้แอนติซีรัมที่ผลิตได้ความเข้มข้น 1: 1000 เป็นตัวทดสอบ

การทดลองวิจารณ์ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างโรค

ได้ตัวอย่างโรคแสดงอาการจุดฉ่ำน้ำโดยรอบแผลจากใบมะเขือเทศจากอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และให้รหัส NO. 260

การแยกเชื้อแบคทีเรีย

ได้เชื้อที่มีโคโลมีสีเขียวอมเหลืองจากการแยกเชื้อด้วยการ streak plate และ โดยการวางชิ้นพืชบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

วิธีทดสอบความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย

พบลักษณะอาการโรคบนใบหลังจากเพาะเชื้อแล้ว 3 วัน อาการเริ่มแรกบนใบจะเห็นเป็นจุดกลมๆเล็ก ๆ ฉ่ำน้ำสีเขียวจาง ๆ จากนั้นแผลจะขยายออกไป มีรูปร่างกลมไม่สม่ำเสมอสีน้ำตาลและบริเวณกลางแผลจะมีสีน้ำตาล เซลล์ของพืชตายจึงมีลักษณะเป็น nerotic ต่อไปใบจะเหลืองจะร่วงไปในที่สุด

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาลักษณะทางทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและ ELISA พบว่าเชื้อ NO 260 ตรงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (ตารางที่ 3)

การหาค่า titerและความไวจำเพาะ(Sensitivity) ของแอนติซีรัม

จากการตรวจหาค่า titer ของแอนติซีรัมเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*NO 260 โดยวิธี ELISA และDIBAพบว่า titer ของแอนติซีรัม ที่เจาะครั้งแรกได้ค่า titer เพียง 1:5,000 แต่ในครั้งที่ 2 ครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 มีความสูงถึง 1:20,000 การที่ titer ที่เจาะในครั้งแรกมีค่าต่ำน่าจะเนื่องมาจากแอนติเจนหรือเชื้อแบคทีเรียที่ฉีดเข้าไปในกระต่ายเพิ่งเริ่มเข้าไปกระตุ้นให้กระต่ายผลิตแอนติบอดีในร่างกายทำให้ titer ของการเจาะเลือดครั้งแรกมีค่าต่ำ เมื่อเจาะในครั้งที่ 2, 3 และ 4 กระต่ายได้ผลิตแอนติบอดีขึ้นมาสูงสุดแล้ว เช่นเดียวกับที่Ball *et al*.,(1990) ได้รายงานไว้ แอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความไวในการตรวจหาเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ในปริมาณต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี ELISA (ตารางที่4)และ DIBA(ตารางที่5)

การทดสอบความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัม (Specificity of antiserum) กับเชื้อแบคทีเรียต่างๆ

จากการทดสอบแอนติซีรัมที่ผลิตกับเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด 14 ไอโซเลท พบว่าแอนติซีรัมของเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ที่ผลิตได้เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri, X. campestris* pv. *campestris, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* pv. *carotovora, Pseudomonas solanacearum* รวม 10 ไอโซเลท แสดงว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* (ตารางที่6)

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ และแอนติซีรัมที่ซื้อ

ผลการทดลองพบว่าเมื่อนำแอนติซีรัมไปตรวจสอบกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* พบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้ และแอนติซีรัมที่ซื้อให้ผลการเกิดปฏิกิริยาเหมือนกัน โดยสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุด10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 7)

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตกับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

ผลการทดลองพบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จากเมล็ดมะเขือเทศโดยวิธี ELISA และ DIBA โดยสามารถตรวจสอบเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อ ต่ำสุด 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8)

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างและจำแนกชนิดใบจุดของมะเขือเทศ ที่ อ . ปากช่อง จ. นครราชสีมา โดยการตรวจคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี และ ชุดตรวจสอบ ELISA Kit พบว่าเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* No. 260 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรงมาผลิตแอนติซีรัมโดยวิธี Glutaraldehyde fix cell และใช้ความเข้มข้น 10^9 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ฉีดกระต่ายทดลองพันธุ์ New Zealand สีขาว 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 2, 3 และครั้งที่ 4 มีค่า titer สูงสุดคือ 1:20,000 เมื่อทดสอบโดยวิธี ELISA และ DIBA รวมทั้ง แอนติซีรัมที่ผลิตได้มี ความไวจำเพาะในการตรวจหาเชื้อได้ที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของแอนติซีรัมที่ใช้คือ1:1000

จากการศึกษาความเฉพาะเจาะจงของแอนติซีรัมพบว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *X. campestris* pv. *citri, X. campestris* pv. *campestris, X. oryzae* pv. *oryzae, Erwinia carotovora* pv. *carotovora, Pseudomonas solanacearum* ทั้งหมด 10 ไอโซเลท แสดงว่าแอนติซีรัมที่ผลิตได้มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* เท่านั้นและเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria* จะตรวจพบเชื้อได้ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุดคือ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมที่สั่งซื้อจากต่างประเทศผลให้การเกิดปฏิกิริยาเหมือนกัน

เอกสารอ้างอิง

Allan, E. and A. Kelman. 1977. Immunofluorescent strain procedures for detection and identifcation of *Erwinia carotovora* var. *carotovora.* Phytopathology. 67:1305-1312.

Ball, E.M., R.O. Hampton, S.H. De Boer and N.Schaad. 1990. Polyclonal. p.33-54 In (R.O. Hampton, E.M. Ball, S.H. Boer; eds). Serological methods for detection and identification of virail and bacterial plant pathogens a laboratory manual The American Phytopathological Society st. Paul Mimmesota.

Breed, R. .S., E.G.D. Murry and N. R. Smith. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed. By William & wilkins Co, Baltimore U.S.A.

Civerolo, E.L. and F.Fan,1982. *Xanthomonas campestris* pv. *citri* detecting and identification by Enzyme linked immunosorbent assay. *Plant* Dis. 66:231-235.

Clark, M.F., 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19:83-106.

Dye, D.W., 1960. Pectolytic Activity in Xanthomonas *N.A.J. of Sci*. 3:61-69.

Dye, D.W., 1962. The inadequacy of the usnal determinative tests for the identification of Xanthomonas spp. *N.Z.J. of Sci* 5:395-416.

Good, M.J., and S.Myron, 1980. Prevention the Key to controlling Bacterial Spot and Bacterial Speck of Tomato. *Plant Dis* 64:831-834.

Hamplton, R.O, E.M. Ball, S.H. De Boer, 1990. Serological methods for detection and identification of virail and bacterial plant Pathogens a laboratory manual. The American Phytopathological society St. Paul Minnesota

Holt, J.G., N.R., Krieg : P.H.A., Sneath , J.T. Staley . and S.T. Williams , 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed.by Williams & Wilkins, Baltimore, USA 376 p.

Lawrence, R.C., 1967. Microbial lipases and related esterases Part 1. Debtection, Distribution and production of Microbial lipases. Dainy Sci. Abstr. 29(11) : 1-8.

Schaad, N.W., J.B. Jones, and W. Chun. 2001 In Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacterid. Third Edition. APS PRESS, St. Paul, Minnesota p. 178-200

ตารางที่ 1 ข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ พ.ศ 2545-2546

ลำดับที่	รายชื่อประเทศที่นำเข้า	ปริมาณการนำเข้า (กก.)	บริษัทที่นำเข้า
1	เนเธอร์แลนด์ (ฮอลแลนด์)	890.582	**บจก. อดัมส์เอ็นเตอร์ไพรเซส, บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์** บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. ดัชท์ กรีนเนอร์รี่ บจก. ที.เอส.เอ
2	อิตาลี	2.467	บจก. อดัมส์เอ็นเตอร์ไพรเซส, บจก. เอ็ อี เอ็นเตอร์ไพรเซส
3	อิสราเอล	1.811	**บจก. ที เอ็น ซีดส์, บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. ที เค อาร์** บจก. เจียไต๋เมล็ดพันธุ์, บจก. ไทยโกลเด้นซีดส์
4	จีน	0.244	บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. เมล็ดพืชพันธุ์ตราสิงห์
5	สหรัฐอเมริกา	2,297.987	บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. จีเนียนเมล็ดพันธุ์ บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. ไทยซูนฟูดส์ บจก. ซันซีดส์, บจก. ซินเจนทาซีดส์, บจก.อีสเวส ซีดส์ บจก. เจียไต๋เมล็ดพันธุ์, บจก. เฮง ฮวด เฮง
6	เกาหลี	23.75	บจก. เซมินิส เวเจทเทเบิ้ล ซีดส์, บจก. เมล็ดพืชพันธุ์ตราสิงห์
7	ญี่ปุ่น	11.748	บจก. ซาคาตะ, บจก. เซี่ยง เฮง ซีดส์
8	เวียดนาม	0.24	บจก. เมล็ดพืชพันธุ์ตราสิงห์
9	อินเดีย	25.061	บจก. ซินเจนทาซีดส์, บจก.นามธารี ซีดส์
10	ฝรั่งเศส	0.395	บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก.จีเนียนเมล็ดพันธุ์, บจก. เอ.จี.ยู
11	ไต้หวัน	154.14	บจก. เพื่อนเกษตร
12	อิสราเอล	1.811	บจก. ที เอ็น ซีดส์, บจก. ซีนเมล็ดพันธุ์, บจก. ที เค อาร์, บจก. เจียไต๋เมล็ดพันธุ์, บจก. ไทยโกลเด้นซีดส์
13	เดนมาร์ก	0.505	บจก. เรียว ซีดส์
14	อินโดนีเซีย	370	บจก. อีสเวท ซีดส์
รวม	**14 ประเทศ**	**3,780.3741**	**24 บริษัท**

ตารางที่ 2 ก รายชื่อเชื้อโรคศัตรูพืชที่ประเทศผู้ซื้อต้องการให้รับรองในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์

พืช	เชื้อโรคและศัตรูพืช	ประเทศผู้ซื้อ
มะเขือเทศ (Tomato) (*Lycopersicon esculentum*)	**<u>เชื้อรา</u>** *Claviceps sclerotia* ***Colletotrichum coccoides*** *Colletotrichum phomoides* *Didymella lycopersici* *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici race* III *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* *Phoma destructiva* *Phoma rostrupi* *Phytophthora capsici* *Phytophthora infestans* *Verticillium albo-atrum* *Verticillium dahliae* *Verticillium tricarpus* **<u>แบคทีเรีย</u>** *Acidovorax* sp. ***Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*** (*Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*) (*Corynebacterium michiganense*) (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) (*Corynebacterium sepedonicum*) *Erwinia corotovora* var. *carotovora* ***Pseudomonas corrugata*** ***Pseudomonas solanacearum*** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *(Pseudomonas punctulans)* *Xanthomonas campestris* pv. *carotae* ***Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria**** **<u>ไวรัส</u>** Arabis Mosaic Virus **Capsicum Mosaic Virus** Cucumber Mosaic Virus (CMV)*	สหรัฐอเมริกา, ฝรั่งเศส, เนเธอร์แลนด์ , อิตาลี, ญี่ปุ่น, อิสราเอล, สเปน, อัฟริกาใต้

พืช	เชื้อโรคและศัตรูพืช	ประเทศผู้ซื้อ
มะเขือเทศ (Tomato) (*Lycopersicon esculentum*)	Cucumber Ring Spot Virus (CRSV) Pepino Mosaic Virus (PeMV) Potato Mop Top Virus (PMTV) Potato Yellow Dwarf Virus Potato Virus Y Squash comovirus Tobacco Mosaic Virus (TMV)* Tobacco Rattle Virus (TRV) Tomato Black Ring Virus (TBRV) Tomato Bushy Stunt Virus (TBSV) Tomato Mosaic Virus* (ToMV) Tomato Ring Spot Virus (TRSV) Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) Tomato Streak Virus (TSV) Tomato Yellow Virus (TYV) **ไวรอยด์** Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) (Tomato Bunchy Top Virus) **ไมโคพลาสมา** Potato Witches Broom (MLO) Tomato Big Bud (MLO) Tomato stolbur (MLO) **ไส้เดือนฝอย** *Heterodera schachtii* *Cacoecimorpha pronubane* *Dermestidae beetles* *Trogoderma* spp. **วัชพืช** Cuscuta spp. (Dodder)	สหรัฐอเมริกา, ฝรั่งเศส, เนเธอร์แลนด์ , อิตาลี, ญี่ปุ่น, อิสราเอล, สเปน, อัฟริกาใต้

* ข้อมูลจากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ตารางที่ 2 ข รายชื่อเชื้อโรคศัตรูพืชที่ประเทศผู้ซื้อต้องการให้รับรองในเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออก

พืช	เชื้อโรคและศัตรูพืช	ประเทศผู้ซื้อ
มะเขือเทศ (Tomato) (*Lycopersicon esculentum*)	**<u>เชื้อรา</u>** *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *Fusarium oxysporum* race III ***Didymella ligulicola*** ***Deplodina lycopersici*** ***Phytophthora capsici*** **<u>แบคทีเรีย</u>** ***Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*** *Corynebacterium michiganenense* pv *michiganense* ***Pseudomonas pustulena*** (*Pseudomonas punctulans*) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ***Pseudomonas corrugata*** *Pseudomonas solanacearum* **<u>ไวรัส</u>** Tobacco streak virus Tomato ring spot virus (TRSV) Arabis Mosaic virus Tomato mosaic virus (ToMV) Pepino mosaic virus (PeMV) Tobacco mosaic virus (TMV) Tomato Bushy stunt virus (TBSV) **<u>ไวรอยด์</u>** Potato spindle tuber viroid Tomato Bunchy top virus	มาเลเซีย, เมริเซียส, อินเดีย, ไอสแลนด์, อิสราเอล, สหรัฐอเมริกา, ซิมบับเวย์, ศรีลังกา, ญี่ปุ่น

* ข้อมูลจากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบลักษณะของเชื้อที่แยกจากมะเขือเทศเป็นโรคใบจุด

ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของแบคทีเรีย (NO. 260)	ผลการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา	
	ปฏิกิริยาทดสอบ	ผลปฏิกริยา
รูปร่าง เป็นแท่ง	Oxidase test	-
การติดสี แกรมลม	Catalase test	+
การเคลื่อนไหว มี flagella	Arginine dihydrolase	+
ขนาดของเซลล์ 0.7x 1.8 um	Indole production	-
ลักษณะของโคโลนีบนอาหารชนิดต่างคือ	Litmus milk	+
1. บนอาหาร NA อายุ 3 วัน โคโลนี กลม นูน มัน ขอบเรียบ สีเหลืองอมเขียว	Hydrolysis of starch	+
	Hydrolysis of Tween 80	-
2. บน King' s medium B โคโลนี กลม นูน สีเหลือง ขอบเรียบ ไม่เปลี่ยนสีอาหาร	Hydrolysis of Gelatin	-
	Urease production	-
	H_2S production	+
3. GyCA โคโลนีกลมนูนเยิ้มเป็นเมือกสีเหลือง เชื้อเจริญเติบโตบนอาหารได้ดี	ปฏิกิริยาการสร้าง acid จาก	
	D-glucose	acid
4. การย่อยบนมันฝรั่ง (Protopectinase activity) เชื้อนี้จะเติมโตบนมันฝรั่งมีลักษณะเยิ้มเป็นมันและสามารถย่อยมันฝรั่งได้ทำให้มันฝรั่งยุบตัวลง	D-galactose	acid
	Saccharose	acid
	Lactose	acid
	Raffinose	acid
	L – Inositol	-
	D – xylose	acid
	Cellobiose	acid
	D-sorbitol	-
	Dulcitol	-
	D + mannose	acid
	Rhamnose	-
	L –Arabinose	acid
	Dextrose	acid
	Maltose	acid
	Erythritol	-

ลักษณะทางสัญฐานวิทยาของแบคทีเรีย (NO 260) (ต่อ)	ผลการทดสอบทางชีวเคมีและสรีรวิทยา	
	ปฏิกิริยาทดสอบ	ผลปฏิกิริยา
	Salicin	-
	Mannitol	-
	L – iso – lencine	acid
	D + Melibiose	-
	Adenine	-
	Adonitol	-
	D – ribose	acid
	Glycerol	acid
	Tyrosinase	acid

ตารางที่ 4 แสดงผลการหาค่า Titer และความไวจำเพาะ ของแอนติซีรัม โดยวิธี ELISA

ความเข้มข้น ของ แอนติซีรัม	สัปดาห์ที่ 1 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 2 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 3 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 4 ความเข้มข้นของเชื้อ							
	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	10^{5}	10^{6}	10^{7}	10^{8}
ELISA 1:100	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1: 5 0 0	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:1,000	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:5,000	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:15,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+3	+3	+3	+3	+3	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4	-	-	-	+4	+4	+4	+4	+4
1:25,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:35,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.134

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.201-0.360 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.361-0.512 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.513-0.987 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.988 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

ตารางที่ 5 แสดงผลการหาค่า Titer และความไวจำเพาะ ของแอนติซีรัม โดยวิธี DIBA

ความเข้มข้น ของ แอนติซีรัม	สัปดาห์ที่ 1 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 2 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 3 ความเข้มข้นของเชื้อ								สัปดาห์ที่ 4 ความเข้มข้นของเชื้อ							
	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
DIBA 1:100	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1: 5 0 0	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:1,000	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:5,000	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:15,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:20,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
1:25,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:35,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ปฏิกิริยาบวก เกิดจุดสีม่วง

\- ปฏิกิริยาบวกลบ ไม่เกิดจุดสีม่วง

ตารางที่ 6 สายพันธุ์แบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตแอนติซีรัมและศึกษาปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ได้จากเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

หมายเลข	ชื่อ	พืชอาศัย	แหล่งที่มา	ปฏิกิริยา ELISA
1	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	ขอนแก่น	+4
2	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	อุดรธานี	+4
3	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	ขอนแก่น	+4
4	*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*	มะเขือเทศ	ขอนแก่น	+4
931	*Xanthomonas campestris* pv. *citri*	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	-
1007	*Xanthomonas campestris* pv. *citri*	มะนาว	เพชรบุรี	-
12	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	คะน้า	กาญจนบุรี	-
53	*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*	บลอคเคอร์ลี่	กรุงเทพฯ	-
7	*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*	ข้าว	ปทุมธานี	-
0 0 8	*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*	ข้าว	ปทุมธานี	-
253	*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*	กะหล่ำ	ปทุมธานี	-
262	*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*	ผักกาดหอม	สุราษฎร์ธานี	-
238	*Pseudomonas solanacearum*	ขิง	ชุมพร	-
334	*Pseudomonas solanacearum*	มะเขือเทศ	หนองคาย	-

หมายเหตุ : 1/ Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.100

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.150-0.179 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.180-0.259 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.260-0.349 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.350 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้กับแอนติซีรัมที่นำเข้าจากต่างประเทศ ELISA

แอนติซีรัม	ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*							
	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
แอนติซีรัมที่ผลิต	-	-	-	+3	+4	+4	+4	+4
แอนติซีรัมของ Agdia	-	-	-	+3	+4	+4	+4	+4

Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.134

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.201-0.360 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.361-0.512 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.513-0.987 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 มากกว่า 0.988 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

ตารางที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัม กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

แอนติซีรัม	ความเข้มข้นของปริมาณเชื้อ *X. campestris* pv. *vesicatoria*							
	10	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
ELISA[1/]	-	-	-	+3	+4	+4	+4	+4
DIBA[2/]	-	-	-	+	+	+	+	+

1/ Negative control ที่ OD 405 มีค่าเท่ากับ 0.177

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.266-0.400 ให้ผลการทดสอบเป็น +1

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.401-0.645 ให้ผลการทดสอบเป็น +2

ค่า OD 405 ระหว่าง 0.646-0.999 ให้ผลการทดสอบเป็น +3

ค่า OD 405 มากกว่า 1.000 ให้ผลการทดสอบเป็น +4

2/ + ปฏิกิริยาบวก เกิดจุดสีม่วง

- ปฏิกิริยาลบ ไม่เกิดจุดสีม่วง

ศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ Squash Mosaic Virus ของพืชตระกูลแตงบางชนิด[1]

Study on the Efficacy of Detection Techniques of Squash Mosaic Virus (SqMV) in Some Cucurbitaceous Crops

ชลธิชา รักใคร่ ดรุณี วงศ์ศศิธร[2]
สุรพล ยินอัศวพรรณ ปรียพรรณ พงศาพิชญ์
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการด่างที่สงสัยว่าจะมีสาเหตุจากเชื้อ squash mosaic virus (SqMV) จากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน สควอช แตงกวา และแตงโมเพื่อการส่งออกของเกษตรกรในท้องที่จังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม มาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อ SqMV 3 วิธี คือ วิธีปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ วิธีตรวจสอบอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และวิธีอิไลซา (Enzyme-linked Immunosorbent Assay: ELISA) ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนของสถานกักพืช ฝ่ายกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ผลการศึกษาพบว่า การตรวจสอบใบพืชที่เป็นโรคด้วยวิธีอิไลซาเป็นวิธีการตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อ SqMV ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีความไว (sensitivity) สูง แม่นยำ และสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมากภายในเวลาเพียง 8-10 ชั่วโมง นับเป็นวิธีการซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการรับรองเมล็ดพันธุ์ปลอดโรค เนื่องจากในการตรวจสอบเพื่อรับรองการปลอดศัตรูพืช มีจำนวนแปลงของเกษตรกรหลายร้อยรายที่ต้องตรวจสอบ และในการปฏิเสธการ รับรองจะต้องมีหลักฐานการตรวจพบศัตรูพืชที่แน่นอน สำหรับการตรวจสอบเชื้อ SqMV จากเมล็ดพันธุ์เมลอนและแตงกวา ซึ่งเก็บจากแปลงปลูกที่ได้ตรวจพบโรคในระยะที่พืชกำลังเจริญเติบโต โดยวิธีตรวจจากเมล็ดโดยตรง และวิธีตรวจจากต้นกล้าระยะใบจริง 1-2 ใบโดยวิธีอิไลซา ผลปรากฏว่าการตรวจสอบจากเมล็ดโดยตรงไม่สามารถตรวจพบเชื้อ SqMV ที่ติดมา แต่การตรวจสอบจากต้นกล้าในช่วงระยะเวลาที่มีใบจริง 1-2 ใบ สามารถตรวจพบเชื้อ SqMV จากเมล็ดพันธุ์เมลอนได้

---

[2] สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร

คำนำ

โรคใบด่างของพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อ Squash Mosaic Virus (SqMV) นับเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่สำคัญชนิดหนึ่งของพืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกระยะของการเจริญเติบโต และเข้าทำลายพืชได้ทุกส่วน ลักษณะอาการของโรคขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส ชนิดพืช และพันธุ์ที่ใช้ปลูก ในสควอช อาจทำให้เกิดอาการผิดรูป (distsortion) ที่ใบ ทำให้ผลเกิดอาการด่างแบบ Mottle และมีผลที่มีรูปร่างผิดปกติ ลำต้นแคระแกร็น เชื้อ SqMV จัดอยู่ในกลุ่ม Comovirus มีอนุภาคเป็นแบบทรงกลม (isometric) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร อนุภาคมีคุณสมบัติที่มีความคงทนสูง (very stable virus) Nelson and Knuhtsen (1973) รายงานว่า อาจตรวจพบเชื้อ SqMV ได้ทุกที่ที่มีการปลูกพืชตระกูลแตง และจะมีบทบาทสำคัญในการแพร่กระจายหรือระบาดไปยังแปลงปลูกพืชตระกูลแตงรุ่นต่อ ๆ ไป

วิธีการแพร่กระจายของโรคที่สำคัญประการหนึ่ง คือ ผ่านทางธุรกิจการค้าเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศจากประเทศหนึ่งไปยังอีกประเทศหนึ่ง มีรายงานเชื้อ SqMV ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ครั้งแรก ตั้งแต่ปี 1934 (Kendrick, 1934) โดยตามปกติความสามารถในการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ของเชื้อ SqMV ที่ได้มีการศึกษาแล้วพบว่า หากมีเมล็ดพันธุ์ติดเชื้อ SqMV อยู่ระหว่าง 0.1-10% จะสามารถทำให้ต้นกล้าเป็นโรคได้ประมาณ 10% (Grogan *et al.*, 1959) มีรายงานว่าการถ่ายทอดโรคนี้ผ่านทางเมล็ดพันธุ์อาจสูงถึง 94% (Rader *et al.,* 1947) ดังนั้น การใช้เมล็ดพันธุ์จากแหล่งที่น่าเชื่อถือ และนำเข้าจากประเทศที่มีระบบการรับรองการปลอดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพจะช่วยลดความสูญเสียจากโรคใบด่างของพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อ SqMV นี้ได้

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลการแพร่ระบาดของโรคใบด่างของพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อ SqMV ที่ชัดเจน ปัจจุบันมีการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมของพืชตระกูลแตงเพื่อส่งออกไปจำหน่ายในต่างประเทศหลายชนิด เช่น เมลอน สควอช แตงกวา และแตงโม ดังเช่นในปี พ .ศ. 2543 มีการส่งออกคิดเป็นมูลค่า 119 ล้านบาท (นิรนาม, 2543) ในการส่งออก ผู้ซื้อหลายประเทศต้องการให้มีระบุข้อความรับรองพิเศษ ในช่อง Additional Declaration ของใบรับรองปลอดศัตรูพืช ว่าเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตมาจากแปลงที่ปราศจากโรคใบด่างสาเหตุจากเชื้อไวรัส SqMV หรือให้รับรองว่า ไม่มีเชื้อ SqMV ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ดังนั้นเพื่อป้องกันมิให้มีโรคร้ายแรงชนิดนี้ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออกเพื่อเป็นการส่งเสริมการส่งออก และเพื่อให้สินค้าผลิตผลการเกษตรของประเทศไทยมีคุณภาพดี เป็นที่ยอมรับของนานาประเทศในตลาดโลก จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อ SqMV ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งให้ผลแน่นอน แม่นยำ และสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละจำนวนมาก ในเวลาอันรวดเร็ว การศึกษาในครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการตรวจสอบเชื้อ SqMV ในเมล็ดพันธุ์หลังการเก็บเกี่ยว

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจสอบเชื้อ SqMV ของพืชตระกูลแตงบางชนิดนั้น จะดำเนินการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคจากแปลงปลูกของเกษตรกร (ภาพที่ 1) และจากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ ภายหลังการเก็บเกี่ยวจากแปลงที่ตรวจพบโรคนี้ โดยดำเนินการศึกษาและทดลองดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรค

ทำการสำรวจพื้นที่ปลูกพืชตระกูลแตง 4 ชนิด ได้แก่ เมลอน สควอช แตงกวา และแตงโม ในเขตจังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม เก็บตัวอย่างใบจากส่วนยอดที่แสดงอาการด่าง (mosaic) จากเชื้อ SqMV ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์สำหรับส่งออก ในช่วงฤดูแล้งของฤดูการผลิตปี 2542/2543 ซึ่งแต่ละแปลงมีขนาดประมาณ 1-3 ไร่ ในการเก็บตัวอย่าง จะเก็บระยะกำจัดเกสรตัวผู้หรือ ตอนดอกก่อนการผสมเกสร (อายุประมาณ 40-45 วัน หลังงอก) อันเป็นระยะที่จะสามารถตรวจพบโรคพืช อันมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสได้มากกว่าระยะพืชเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว (Dikova, 1999) ทำการตรวจสอบทุกต้นและทุกแถวในแปลงปลูก โดยสังเกตบริเวณส่วนที่แสดงอาการผิดปกติ เช่น ใบแสดงอาการด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ลำต้นแคระแกร็น ยอดอ่อนแสดงอาการบิดเบี้ยว ใบหด บิดเบี้ยว ใบมีขนาดเล็กลงกว่าปกติ นำตัวอย่างใบที่เก็บได้บรรจุใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลเกี่ยวกับชื่อพืช ลักษณะอาการที่พบ ชื่อเกษตรกร แล้วนำมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการโรคพืชของฝ่ายกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อ SqMV

ทำการศึกษาจากตัวอย่างใบพืชเป็นโรคใบด่างทั้ง 4 ชนิด รวม 98 ตัวอย่าง ได้แก่ เมลอน 42 ตัวอย่าง สควอช 25 ตัวอย่าง แตงกวา 17 ตัวอย่าง และแตงโม 14 ตัวอย่าง ที่เก็บจากแปลงปลูกของเกษตรกร โดยแบ่งตัวอย่างพืชดังกล่าวออกเป็น 3 ส่วน เพื่อใช้ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อตามขั้นตอนดังนี้

2.1 การตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Infectivity test) นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคใบด่างมาทดสอบการเป็นโรค ด้วยวิธีการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบตามวิธีของ Matthews (1993) โดยในการทดลอง ใช้พืชทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ สควอช (*Cucurbita pepo*) แตงกวา (*Cucumis sativus*) และแตงโม (*Citrullus lanatus*) ทำการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยเตรียมน้ำคั้นที่ได้จากการบดใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติ ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ในอัตรา 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในสภาพแช่เย็น ก่อนปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ได้ทำแผลบนใบพืช โดยโรยด้วยผงคาโบรันดัม (carborandum ขนาด 600 mesh) โดยใช้พืชทดสอบ 10 ต้น ต่อตัวอย่างพืชแต่ละชนิด จากนั้น ใช้สำลีที่สะอาดจุ่มน้ำคั้นพืช ทาลงบนใบยอดของพืชทดสอบ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5 นาที ล้างใบพืช และนำพืชทดสอบไปเก็บไว้ในโรงปลูกพืชที่มีอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส สังเกตอาการบนพืชหลังปลูกเชื้อ 1-4 สัปดาห์ ในกรณีของแตงโม พืชทดสอบอาจจะแสดงอาการมีแผลเฉพาะแห่ง (local lesions) (Nelson and Knuhten, 1969) หรืออาการแบบกระจายทั่วลำต้น (systemic infection) ในกรณีของสควอชและแตงกวา แล้วนับจำนวนต้นที่เป็นโรค

2.2 การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อ SqMV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน นำตัวอย่างพืช อีกส่วนหนึ่ง ที่เก็บจากแปลงมาตรวจสอบหาอนุภาค (particle) ของเชื้อ SqMV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน โดยบดตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติที่เก็บมาใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 อัตรา 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้น หยดน้ำคั้นซึ่งเตรียมไว้บนแผ่นพาราฟิล์ม วางกริด (grid) ด้านที่เคลือบด้วยฟอร์มวาร์ (Formvar) ให้สัมผัสกับหยดน้ำคั้นพืชเป็นเวลา 5-15 นาที ล้างกริดด้วยน้ำกลั่น 30 หยด แล้วย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate 7 หยด ซับให้แห้ง แล้วนำกริดไปตรวจสอบหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ที่ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ต่อไป

2.3 การตรวจสอบเชื้อ ด้วยวิธีอิไลซา (Enzyme-linked Immunosorbant Assay: ELISA) วิธีนี้เป็นวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความไวสูง(Clark *et al.*, 1976) แม้ตัวอย่างมีเชื้อไวรัสปริมาณต่ำ หรืออนุภาคแตกหัก ก็สามารถตรวจได้ ให้ผลรวดเร็วแน่นอน (Korpraditskul *et al.,* 1979) และตรวจสอบได้ครั้งละจำนวนมาก วิธีการอิไลซาที่นำมาใช้เป็นแบบ Indirect ELISA (Albrechtsen, 1992) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

2.3.1 เตรียมน้ำคั้นพืช โดยบดใบพืชที่แสดงอาการใบด่างใน General extract buffer อัตรา 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เทน้ำคั้นลงในหลอดทดสอบตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที จึงนำไปหยอดลงในหลุมของภาชนะทดสอบ (microtiter plate) หลุมละ 100 µl โดยมี Negative control และ Positive control อย่างน้อยถาดละ 2 หลุม นำไปบ่มไว้ในกล่องชื้น (กล่องพลาสติกใส่กระดาษชื้น) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

2.3.2 ล้างภาชนะทดสอบด้วย PBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

2.3.3 เตรียมแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส (anti-SqMV) ที่ต้องการตรวจสอบ โดยเตรียมใน serum buffer อัตราส่วน 1:100 ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที จากนั้น นำไปหยอดลงในหลุมที่ล้างส่วนเกินออกแล้ว หลุมละ 100 µl แล้วนำไปบ่มไว้ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

2.3.4 ล้างภาชนะทดสอบ เช่นเดียวกับข้อ 2

2.3.5 เตรียมแอนติบอดีต่อเอนไซม์ (Enzyme-labelled goat anti-rabbit conjugate) โดยเตรียมใน serum buffer อัตราส่วน 1: 1000 ผสมให้เข้ากันดี แล้วตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที จึงนำไปหยอดลงในภาชนะทดสอบ หลุมละ 100 µl แล้วนำไปบ่มไว้ในกล่องชื้น ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

2.3.6 ล้างภาชนะทดสอบในข้อ 1 เช่นเดียวกับข้อ 2

2.3.7 เตรียมซับสเตรท (substrate) โดยใช้ p-nitrophenol phosphate 0.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน Diethanolamine buffer โดยให้เตรียมใหม่ทันทีก่อนใช้ เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว นำไปหยอดในภาชนะทดสอบ หลุมละ 200 µl แล้วนำภาชนะทดสอบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตรวจปฏิกิริยา โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับ substrate ที่เฉพาะ

2.3.8 หยุดปฏิกิริยาด้วย 3 M NaOH หลุมละ 50 µl

2.3.9 ตรวจปฏิกิริยาโดยสังเกตการเกิดสี หากปฏิกิริยาเป็นบวก จะปรากฏสีเหลืองมองเห็นด้วยตาเปล่า หรือวัดความเข้มข้นของสีด้วยเครื่องอ่านผลอิไลซา โดยอ่านค่า absorbance ที่ 405 นาโนเมตร ค่าที่วัดได้สูงกว่าค่าปกติ (buffer) 2 เท่าขึ้นไป ให้ถือว่าเป็นปฏิกิริยาบวก

3. การตรวจสอบเชื้อ SqMV ในเมล็ดพันธุ์จากแปลงที่พบโรค

สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เมลอนและแตงกวาจากแปลงปลูก ซึ่งได้ตรวจพบเชื้อ SqMV จากใบพืชในช่วงระยะตอนดอกผสมเกสรในแปลงปลูกดังกล่าว ในเขตจังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม จังหวัดละ 1 แปลง นำเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยวมาตรวจสอบ ดังนี้

3.1 การตรวจสอบเชื้อ SqMV จากเมล็ดพันธุ์โดยตรง นำเมล็ดพันธุ์เมลอนและแตงกวาภายหลังเก็บเกี่ยวจากแปลงที่ตรวจพบเชื้อ SqMV จากตัวอย่างใบพืชตัวอย่างละ 1 แปลง นำมาสุ่มตัวอย่าง ตามวิธีการของสมาคมทดสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติหรือ International Seed Testing Association (Anonymous, 1999) โดยใช้เมล็ดพันธุ์ตัวอย่างละ 1,000 เมล็ด นำเมล็ดแต่ละตัวอย่าง มาดำเนินการตรวจสอบตามวิธีการของ Franken (1990) โดยแบ่งเมล็ดจาก 1,000 เมล็ดออกเป็น 10 ตัวอย่างๆละ 100 เมล็ด นำมาทดสอบโดยนับเมล็ดออกมา 50 เมล็ด เพื่อบดให้ละเอียด นำมาทดสอบด้วยวิธีอิไลซา ถ้าตัวอย่างใดตามขั้นตอนในข้อ 2.3 ให้ผลบวก ให้นำเมล็ดส่วนที่เหลืออีก 50 เมล็ดไปเพาะ แล้วนำต้นกล้าที่มีอายุ 10 วัน มาตรวจทุกต้นโดยวิธีอิไลซา

3.2 การตรวจสอบเชื้อ SqMV จากต้นกล้าเมลอนและแตงกวาที่ปลูกในสภาพโรงเรือน (Seedling symptom test) เพาะเมล็ดแตงในดินอบฆ่าเชื้อ ตัวอย่างละ 800-1,000 เมล็ด ปฏิบัติดูแลรักษาในสภาพโรงเรือนของสถานกักพืช เมื่อต้นกล้างอกและมีใบจริง 1-2 ใบ ซึ่งมีอายุประมาณ 12-15 วัน ตรวจสอบลักษณะอาการผิดปกติบนต้นกล้า เลือกต้นกล้าที่มีการเจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบแสดงอาการคล้ายลักษณะอาการด่าง นำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิไลซา ตามวิธีการในข้อ 2.3

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองในระหว่างเดือนตุลาคม 2542 – กันยายน 2544 ณ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนของสถานกักพืช ฝ่ายกักกันพืช กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกร ในจังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรค

จากการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างใบของพืช 4 ชนิด คือ เมลอน สควอช แตงกวา และแตงโม ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ จากจังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม ในช่วงฤดูแล้งปี 2542-2543 (ภาพที่ 1) ได้ พบต้นพืชที่แสดงอาการใบด่าง มีลักษณะสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบยอดบิดเบี้ยว ลำต้นแคระแกร็น ผลอ่อนแสดงอาการด่างเป็นจ้ำ ๆ ซึ่งเป็นอาการที่สงสัยว่าจะมีสาเหตุจากเชื้อ SqMV สามารถเก็บตัวอย่างได้จากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน 42 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) จากสควอช 25 ตัวอย่าง แตงกวา 17 ตัวอย่าง และแตงโม 14 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 98 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

จากการสังเกต พบว่าช่วงระยะที่พบพืชแสดงอาการใบด่างที่สังเกตได้ง่ายจะอยู่ในระยะช่วงตอนดอกเพื่อการผสมเกสรมากกว่าช่วงที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนเก็บเกี่ยว ซึ่งในระยะนี้มีแมลงเข้าทำลายมาก ตัวอย่างใบพืชมีลักษณะของอาการโรคหลายชนิดปะปนกันอยู่ และอาจมีไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ทำให้การวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยสายตาทำได้ยาก

2. การตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อ SqMV

2.1 การตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ เมื่อนำตัวอย่างพืช เมลอน สควอช แตงกวา และแตงโมที่เก็บจากแปลงปลูกมาทดสอบการเป็นโรค โดยวิธีการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ สควอช แตงกวาและแตงโม พบว่าตัวอย่างเมลอนเป็นโรคที่เก็บมาสามารถทำให้ต้นสควอชเป็นโรคได้ 5 ตัวอย่าง และทำให้แตงกวาเป็นโรคได้ 1 ตัวอย่าง แต่ไม่ทำให้ต้นกล้าแตงโมเป็นโรค ตัวอย่างจากแตงกวาสามารถทำให้สควอชเป็นโรคได้ 3 ตัวอย่าง และทำให้แตงกวาเป็นโรคได้ 1 ตัวอย่าง แต่ไม่ทำให้แตงโมเป็นโรค ตัวอย่างสควอชและแตงโมที่เป็นโรคไม่ทำให้พืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดเป็นโรค (ตารางที่ 2)

ในพืชทดสอบที่แสดงอาการใบด่าง จะปรากฏอาการบนพืชทดสอบภายหลังการปลูกเชื้อ 7-10 วัน (ภาพที่ 4) โดยมีลักษณะอาการแพร่กระจายตามส่วนต่างๆ ของพืช (Systemic infection) อาการเริ่มจากใบจริงชุดแรกที่เพิ่งเจริญเติบโตขึ้นได้ 2-3 วัน จะเริ่มปรากฏพบอาการใบด่าง รูปร่างใบผิดปกติเล็กน้อย ภายหลังเชื้อเจริญบนพืชทดสอบได้ 2-3 สัปดาห์ ต้นพืชจะเริ่มแคระแกรน ใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และค่อยๆ ตายในที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าพืชทดสอบบางชนิดสามารถแสดงอาการใบด่างได้บ้าง แต่ไม่ชัดเจนจำนวน 4-5 ตัวอย่าง

ในการตรวจสอบโดยวิธีปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบที่จะให้ผลได้ดีนั้น สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งคืออุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแสดงอาการของพืชทดสอบ และต้องให้เวลาในการทำให้เกิดอาการของโรค วิธีนี้จึงอาจไม่สะดวกหากมีปริมาณตัวอย่างที่จะต้องตรวจสอบจำนวนมาก

2.2 การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อ SqMV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน เมื่อนำตัวอย่างของพืชอีกส่วนหนึ่งที่เก็บจากแปลงปลูกมาตรวจสอบหาอนุภาค (particle) ของเชื้อ SqMV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน สามารถตรวจพบอนุภาคของเชื้อ SqMV อนุภาคมีลักษณะทรงกลม (ภาพที่ 5) ขนาดประมาณ 28-30 นาโนเมตร ในตัวอย่างที่เก็บจากเมลอน 4 ตัวอย่าง และแตงกวา 2 ตัวอย่าง ส่วนผลการตรวจสอบตัวอย่างของสควอชและแตงโม ปรากฏว่าไม่พบอนุภาคของเชื้อ SqMV จากตัวอย่างที่ได้ทำการตรวจสอบ

ลักษณะอนุภาคที่พบบางตัวอย่างนั้นมองไม่เห็นอย่างชัดเจน ซึ่งอาจเป็นเพราะในตัวอย่างใบพืชมีปริมาณไวรัสน้อย และเนื่องจากอนุภาคของเชื้อ SqMV มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ขนาดและรูปร่างคล้ายส่วนประกอบในเซลล์พืชหรืออนุภาคของไวรัสชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกันมาก ทำให้การตรวจสอบหาอนุภาคของเชื้อ SqMV ทำได้ยาก การตรวจพบอนุภาคของไวรัสเพียงอย่างเดียว จึงอาจไม่สามารถยืนยันผลได้อย่างแน่ชัด

2.3 การตรวจสอบเชื้อ SqMV ด้วยวิธีอิไลซา ตรวจพบตัวอย่างพืชที่มีปฏิกิริยาให้ผลบวกกับเชื้อ SqMV โดย substrate เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 6) ในเมลอนจำนวน 14 ตัวอย่าง ในแตงกวา 8 ตัวอย่าง แต่ไม่พบเชื้อ SqMV ในสควอชและแตงโม (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบด้วยวิธีอิไลซาสามารถตรวจตัวอย่างจำนวนมากๆ ได้ผลแน่นอนในเวลาอันรวดเร็ว สามารถตรวจตัวอย่างที่มีเชื้อในปริมาณน้อย และอนุภาคแตกหักที่ไม่สามารถบอกแน่ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน หรือการใช้พืชทดสอบ จึงเหมาะสมกับงานกักกันพืชที่ต้องการความรวดเร็ว ความถูกต้อง แม่นยำในการรับรองการปลอดโรคเพื่อการส่งออก

3. การตรวจสอบเชื้อ SqMV ในเมล็ดพันธุ์จากแปลงที่ตรวจพบโรค

จากการเลือกสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์เมลอนและแตงกวา (ภาพที่ 7) จากแปลงปลูกที่ได้ตรวจพบเชื้อ SqMV ที่ใบในแปลงปลูกอย่างละ 1 แปลง มาตรวจสอบเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยวโดยวิธีอิไลซา ได้ผลดังนี้ คือ

3.1 การตรวจสอบเชื้อ SqMV จากเมล็ดพันธุ์โดยตรง ผลการตรวจ ไม่พบเชื้อ SqMV จากเมล็ดพันธุ์ทั้งเมลอนและแตงกวา

3.2 การตรวจสอบเชื้อ SqMV จากต้นกล้าเมลอนและแตงกวาที่ปลูกในสภาพโรงเรือน จากการเลือกต้นกล้าอายุประมาณ 12-15 วัน ที่มีการเจริญเติบโตช้า แคระแกร็น ใบแสดงอาการคล้ายลักษณะอาการด่างมาตรวจสอบโดยวิธีอิไลซา ตามวิธีการในข้อ 2.3 ผลการตรวจ พบเชื้อ SqMV จากต้นกล้าเมลอน 4 ต้น ตรวจไม่พบเชื้อ SqMV จากต้นกล้าแตงกวา

การที่ไม่สามารถตรวจพบ SqMV จากเมล็ดพันธุ์แตงกวาทั้งจากเมล็ดพันธุ์โดยตรงและจากต้นกล้านั้น อาจเนื่องจากไม่มีเชื้อ SqMV ติดมากับเมล็ดพันธุ์แตงกวาจริง แต่การตรวจพบเชื้อ SqMV ได้จากต้นกล้าเมลอน อาจเนื่องจากมีปริมาณไวรัสในเมล็ดพันธุ์น้อยเกินกว่าที่จะสามารถถูกตรวจพบ เมื่อตรวจสอบจากเมล็ดโดยตรง แต่เมื่อนำเมล็ดดังกล่าวมาเพาะเป็นต้นกล้า ไวรัสได้เพิ่มปริมาณในใบของต้นกล้าเมลอน จนมีปริมาณพอที่จะสามารถถูกตรวจพบได้โดยวิธีอิไลซา ดังนั้น เพื่อให้วิธีการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์เมลอน เพื่อรับรองการปลอดเชื้อ SqMV ที่มีประสิทธิภาพ จึงควรตรวจสอบจากต้นกล้าที่เพาะจากเมล็ด ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าการตรวจสอบจากเมล็ดพันธุ์โดยตรง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบของเมลอน สควอช แตงกวา และแตงโม ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อส่งออก ของเกษตรกรจากจังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม ในฤดูแล้งของฤดูการผลิต 2542/43 นำมาศึกษาเปรียบเทียบวิธีจำแนกชนิดของเชื้อ SqMV 3 วิธี คือ วิธีปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ วิธีตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน และการตรวจสอบด้วยวิธีอิไลซา ผลการตรวจสอบทั้ง 3 วิธี ปรากฏว่า ได้ตรวจพบเชื้อ SqMV ในตัวอย่างเมลอนและแตงกวา ไม่พบในตัวอย่างสควอชและแตงโม

เมื่อนำเมล็ดพันธุ์เมลอนและแตงกวาจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ของเกษตรกรที่ตรวจพบเชื้อ SqMV ในช่วงระยะพืชที่กำลังเจริญเติบโต มาตรวจสอบหาเชื้อนี้อีกโดยวิธีอิไลซา ผลการตรวจไม่พบเชื้อ SqMV ทั้งจากเมล็ดพันธุ์เมลอนและแตงกวาโดยตรง แต่ได้ตรวจพบเชื้อ SqMV จากต้นกล้าเมลอนที่เพาะจากเมล็ดพันธุ์ชุดดังกล่าว

จากผลการศึกษาทดลอง จะเห็นได้ว่า การตรวจสอบเชื้อ SqMV โดยวิธีอิไลซามีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีความไว (sensitivity) สูง สามารถตรวจสอบได้แม่นยำ และตรวจสอบตัวอย่างได้จำนวนมากในเวลารวดเร็ว ทั้งนี้ ในการตรวจสอบเพื่อรับรองการปลอดศัตรูพืช มีจำนวนแปลงที่ต้องตรวจสอบมาก และในการปฏิเสธการรับรอง จะต้องมีหลักฐานการตรวจพบศัตรูพืชที่แน่นอน วิธีอิไลซาจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเพื่อรับรองการปลอดเชื้อ ในการออกใบรับรองปลอดศัตรูพืช ทั้งการรับรองการปลอดโรคในช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก และรับรองการปลอดเชื้อ SqMV กับเมล็ดพันธุ์ก่อนส่งออก

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม, 2543. ข้อมูลการนำเข้า-ส่งออกพืช ผลิตผลพืชและวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพ 664 น.

Anonymous. 1999. International Rules for Seed Testing. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 31 (1) : 119-125.

Albrechtsen, S.E. 1992. Testing of seeds for virus. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Denmark. 269 pp.

Clark,M.F. , Adams, A.N. and Barbara D.J. 1976. The detection of plant viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Hort. 67, 43-49.

Dikova, B. 1999. Establishment of SqMV in seeds of sugar beet and cucurbit crop by ELISA method. Bulgaria Journal of Agriculture Science 5: 585-588.

Franken, J.M., Matt, D.L. and Kamminga, G.C. 1990. Detection of squash mosaic virus in seeds of melon (*Cucumis melo*) by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Netherlands Journal of Plant Pathology 96 : (2) 91-102.

Grogan, R.G., Hall, D.H. and Kimble, K.A. 1959. Cucurbit mosaic viruses in California. Phytophatology 49: 366-376.

Kendrick, J.B. 1934. Cucurbit mosaic transmitted by muskmelon seed. Phytopathology 24 : 820-823.

Korpraditskul, P., Casper, R. and Ksemann, D.E. 1979. Evalution of short reaction time and some characteristics of enzyme-conjugation in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Phytopathology. 96: 281-285.

Matthews, R.E.F. 1993. Diagnosis of plant virus diseases. CRC Press, Inc., Florida.247 pp.

Nelson, M.R. and Knuhtsen, H.K. 1969. Relation of seed transmission to the epidemiology of squash mosaic virus strain. Phytopathology 59 :1042.

Nelson, M.R. and Knuhtsen, H.K. 1973. Squash mosaic virus variability: epidemiological consequences of differences in seed transmission frequency between strains. Phytopathology 63:918-920.

Rader, W.E., Fitzpatrick, H.F. and Hildebrand, E.M. 1947. A seed-borne virus of muskmelon. Phytopathology 37: 809-816.

ตารางที่ 1 การตรวจสอบเชื้อ SqMV โดยวิธีอิไลซาจากตัวอย่างพืชตระกูลแตงบางชนิด ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างที่จังหวัดสกลนคร ขอนแก่น และมหาสารคาม ปี 2542 - 2543

ชนิดพืชตระกูลแตง	**ตัวอย่างที่พบอาการด่างในแปลงปลูก**	**ตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ SqMV**
เมลอน	42	14
สควอช	25	0
แตงกวา	17	8
แตงโม	14	0
รวม	98	22

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบเชื้อ SqMV จากตัวอย่างเมลอน สควอช แตงกวา และแตงโมที่เก็บจากแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีปลูกเชื้อลงบนต้นกล้า สควอช แตงกวาและแตงโม ที่ใช้เป็นพืชทดสอบ

ชนิดของพืชทดสอบ	**ลักษณะอาการ**	**จำนวนต้นที่แสดงอาการใบด่างบนพืชทดสอบ / จำนวนพืชทดสอบ**			
		เมลอน	**สควอช**	**แตงกวา**	**แตงโม**
สควอช	systemic	5/420	0/250	3/170	0/140
แตงกวา	systemic	1/420	0/250	1/170	0/140
แตงโม	-	0/420	0/250	0/170	0/140
รวม		6/420	0/250	4/170	0/140

ชีพจักรและการแพร่พันธุ์ของวัชพืชต่างถิ่น (*Lambsquarter : Chenopodium album L.)*

Life Cycle and Reproduction of Alien Weed (*Lambsquarter : Chenopodium album L.)*

นงพร มาอยู่ดี **นวลนิสา ตั้งสัจจกุล**

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

การศึกษาชีพจักรและการแพร่พันธุ์ของวัชพืชต่างถิ่น *Chenopodium album* L. เพื่อทราบข้อมูลการเจริญเติบโตและการแพร่พันธุ์ของแต่ละฤดูในประเทศไทยดำเนินการในเรือนทดลอง ของสถานกักพืชเชียงราย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย การทดลองที่ 1 และศึกษาความงอกที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน เพื่อทราบระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการงอก ดำเนินการในห้องปฏิบัติการของกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฝ่ายพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร การทดลองที่ 2 ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2545 ถึงธันวาคม 2546 โดยทำการปลูกวัชพืช *C. album* จำนวน 3 ครั้ง คือ เดือนกรกฎาคม พฤศจิกายน และมีนาคม จำนวน 50 ต้น ต่อครั้ง รวมทั้งหมด 150 ต้น แล้วนำเมล็ดที่เก็บได้จากการทดลองดังกล่าวไปทดสอบความงอกที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำ 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี คือ การเพาะเมล็ดที่ระดับอุณหภูมิ 10, 15, 20, 25, 30, 20-30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ปรากฏว่า *C. album* ที่ปลูกเดือนมีนาคมเริ่มออกดอกเมื่ออายุเฉลี่ย 42.40 วันหลังจากงอก ส่วนการปลูกเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายนมีการออกดอกช้ากว่า 3-6 วัน เฉลี่ย 45.84 และ 48.16 วัน ตามลำดับ การสุกแก่ของเมล็ดที่ปลูกเดือนพฤศจิกายน เมล็ดแก่เมื่อมีอายุเฉลี่ย 81.12 วัน ซึ่งนานที่สุด รองลงมาคือการปลูกเดือนกรกฎาคม และมีนาคม เฉลี่ย 77.26 และ 68.32 วันตามลำดับ สำหรับการแพร่กระจายพันธุ์พบว่า *C. album* ที่ปลูกเดือนพฤศจิกายนมีความสูงของต้นมากที่สุด เฉลี่ย 130.60 เซนติเมตร รองลงมาเป็นการปลูกเดือนกรกฎาคม และมีนาคม เฉลี่ย 121.16 และ 67.48 เซ็นติเมตร ตามลำดับ ส่วนการแตกกิ่งแขนงต่อต้นมากที่สุดพบเมื่อปลูกเดือนพฤศจิกายน เฉลี่ย 58.20 กิ่ง รองลงมา 37.16 และ 26.96 กิ่ง เมล็ดกับจำนวนช่อดอกต่อต้นมากเมื่อปลูกเดือนพฤศจิกายน รองลงมาเดือนกรกฎาคมและมีนาคม เฉลี่ย 468.34, 307.82 และ 60.30 ช่อ ตามลำดับ สามารถผลิตเมล็ดต่อช่อมากเมื่อปลูกเดือนพฤศจิกายน เฉลี่ย 16.34 เมล็ด รองลงมาคือการปลูกเดือนกรกฎาคม และมีนาคม เฉลี่ย 15.10 และ 12.08 เมล็ดต่อช่อดอก และมีศักยภาพในการผลิตเมล็ดต่อต้นมากที่สุดเมื่อปลูกเดือนพฤศจิกายน เฉลี่ย 5,917.07 เมล็ด รองลงมาเป็นการปลูกเดือนกรกฎาคม และมีนาคม เฉลี่ย 3,800.52 และ 632.96 เมล็ดต่อต้น ส่วนผลการศึกษาความงอกที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ พบว่าเมล็ด *C. album* สามารถงอกได้ตั้งแต่ระดับอุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส แต่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการงอกมากที่สุดคือที่ระดับอุณหภูมิสลับ 20-30 องศาเซลเซียส เฉลี่ย 89.8% ส่วนที่ระดับอุณหภูมิต่ำ 15 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลาในการงอกนานกว่าระดับอุณหภูมิสูง ส่วนในระดับอุณหภูมิต่ำ 10 องศาเซลเซียส และสูง 40 องศาเซลเซียส เมล็ดได้สามารถงอกได้

รหัสทะเบียนวิจัย 45 04005 16

คำนำ

Lambsquarter หรือ Fat Hen (*Chenopodium album L.*) เป็นพืชล้มลุก อายุสั้น ฤดูเดียวจัดอยู่ในวงศ์ Chenopodiaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบยุโรปเขตอบอุ่นและกึ่งอบอุ่น ลำต้นเป็นเหลี่ยมตั้งตรงสีเขียวอ่อน แตกกิ่งมาก ต้นสูงประมาณ 0.3-2.00 เมตร ใบเดี่ยวติดสลับกัน มีก้านใบแต่ไม่มีหูใบขนาด 3.00x1.50-8 เซ็นติเมตร รูปร่างและขนาดของใบไม่คงที่แน่นอนมักแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อม ส่วนใหญ่เป็นรูปไข่ถึงรูปปลายใบหอก ขอบใบหยัก ระยะต้นอ่อนใบส่วนบนถึงยอดจะมีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาวปกคลุมส่วนหลังใบจะมีสีม่วงแดง ดอกเป็นแบบสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยเกสรตัวผู้ 5 อัน เกสรตัวเมีย 1 อัน ช่อดอกมีสีเขียวแจะเกิดที่ปลายกิ่งและมุมใบเป็นกลุ่มติดกันเป็นกระจุกกลมเป็นระยะๆ แตกต่างกันบนแกนช่อดอก เมื่อดอกพัฒนาเป็นผลเปลือกผลบางหนึ่งผลมีพียงเมล็ดเดียว เมล็ดค่อนข้างกลมแบนสีดำ เป็นมัน รูปร่างคล้ายเลนส์นูน ผิวเมล็ดมีเยื่อบางสีน้ำตาลและเทาห่อหุ้ม (Shearer, 1974) มีลักษณะเป็นร่างแหแผ่จากจุดกึ่งกลางเมล็ดทั้งสองด้าน เมล็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.7-1.5 มิลลิเมตร (นงพร และคณะ 2539; Hanf, 1983; Holm, 1977) จากการศึกษาเอกสารต่างประเทศ Holm *et al.,* (1977) ได้รายงานว่า *C. album* จัดเป็นวัชพืชร้ายแรงพบขึ้นทำลายในแปลงปลูกพืชประมาณ 40 ชนิด ใน 47 ประเทศ ต้นใหญ่ที่สมบูรณ์ สามารถผลิตเมล็ดได้ถึง 500,000 เมล็ด พบการแพร่ระบาดในแปลงปลูกมันฝรั่งและซูการ์บีทสามารถผลิตเมล็ดได้ 13,000 เมล็ดต่อต้น นอกจากนี้การศึกษาของ Williams (1963) จากสถานีตรวจสอบเมล็ดพันธุ์แห่งหนึ่งของประเทศอังกฤษพบว่าเมล็ด *C. album* ปะปนมากับเมล็ดพันธุ์แครอทถึงหนึ่ง ใน 3 ส่วนของเมล็ดพันธุ์ทั้งหมด และยังตรวจพบปะปนมากับเมล็ดธัญพืช หญ้าเลี้ยงสัตว์ พืชคลุมดิน timothy ข้าวสาลี และเมล็ด Italian rye grass ส่วน Holm *et al.,* (1977) ได้รายงานการศึกษาของ Johnston (1962) ถึงการแพร่ระบาดของ *C. album* ในแปลงปลูกพืชต่างๆ ในหลายประเทศ ได้แก่ แปลงปลูกผักของประเทศ แคนาดา บัลแกเรีย อลาสกา ฟินแลนด์ อินเดีย ไอร์แลนด์ ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ นอร์เวย์ โปตุเกส สเปน และ สหรัฐอเมริกา แปลงปลูกซูการ์บีทของประเทศอิหร่าน อิตาลี สเปน เบลเยี่ยม ฝรั่งเศษ อังกฤษ และยูโกสลาเวีย ในแปลงปลูกมันฝรั่งของประเทศ เบลเยี่ยม บัลแกเรีย แคนาดา ชิลี ฟินแลนด์ อินเดีย สวีแดน แปลงปลูกข้าวโพดของประเทศ อิตาลี โปตุเกส โรมาเนีย สหรัฐอเมริกา และยูโกสลาเวีย และได้รายงานผลการศึกษาของ Misra. (1969) โดยรายงานการงอกของเมล็ด *C. album* ซึ่งศึกษาทดลองในประเทศอินเดีย พบว่าเมล็ดวัชพืช ดังกล่าวสามารถงอกได้ถึง 45% หลังจากเก็บเมล็ดแก่จากต้นในขณะที่เปลือกยังเป็นสีเขียว ส่วนการศึกษาอุณหภูมิในประเทศแคนาดาพบว่าเมล็ดงอกได้สูงสุดที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดงว่าเมล็ดใหม่ไม่มีการพักตัว *C. album* สามารถปรับตัวตามสภาพแวดล้อมได้อย่างกว้างขวางตามฤดูกาลปลูกที่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ดำเนินการศึกษาชีพจักรและการแพร่พันธุ์ของวัชพืชต่างถิ่น *Chenopodium album* ที่สถานกักพืชเชียงราย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย โดยทำการคัดแยกเมล็ดวัชพืช *Chenopodium album* จากเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวที่นำเข้าจากต่างประเทศ เดือนพฤษภาคม 2544 แล้วนำไปปลูกขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณ หลังจากเก็บเกี่ยวเมล็ดแก่ได้แล้ว จึงนำไปปลูกทดลองในกระถางดินเผา ซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12 นิ้ว โดยแบ่งปลูกจำนวน 3 ฤดู เริ่มต้นเดือนกรกฎาคม - ตุลาคม 2545 เป็นตัวแทนฤดูฝน ปลูกเดือนพฤศจิกายน -กุมภาพันธ์ 2545 เป็นตัวแทนฤดูหนาว และปลูกเดือนมีนาคม -พฤษภาคม 2546 เป็นตัวแทนฤดูร้อน ทำการปลูก จำนวน 50 กระถางต่อฤดู รวมทั้งหมด 150 กระถาง หลังจากปลูก 20 วัน หยอดปุ๋ยยูเรียประมาณ 1 ช้อนชาต่อต้น เมื่ออายุประมาณ 1 เดือน หยอดปุ๋ยสูตร 15-15-15 ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะต่อต้น แล้วปล่อยให้วัชพืชเจริญเติบโตโดยให้น้ำวันละ 1 ครั้งตอนเย็น วิธีการดำเนินการศึกษาได้ทำการบันทึกข้อมูลจำนวนวันงอก การเจริญเติบโตโดยนับ กิ่งแตกแขนงและวัดความสูงของต้น การออกดอกเริ่มนับวันออกดอกแรกและดอกสุดท้าย จำนวนช่อดอก ต่อต้น จำนวนเมล็ดต่อช่อ การแก่ของเมล็ดนับวันแก่ของเมล็ดชุดแรกและชุดสุดท้าย และจำนวนเมล็ดต่อต้น โดยเก็บเมล็ดแก่ของแต่ละต้นรวมกันจนกระทั่งต้นวัชพืชเหลืองแห้งตาย

2. ดำเนินการศึกษาความงอกของวัชพืช *Chenopodium album* ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน ที่กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฝ่ายพันธุ์พืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมเทพฯ โดยนำเมล็ดวัชพืช ซึ่งได้จากการปลูกศึกษาชีพจักรและการแพร่พันธุ์มาศึกษาความงอกโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด นำเมล็ดวัชพืชเพาะลงในกล่องพลาสติกขนาด 4x13.5x19 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร โดยมีทรายละเอียดเป็นวัสดุเพาะพร้อมทั้งมีฝาปิดสิ่งทดลองละ 4 กล่อง รวม 32 กล่อง เมื่อเพาะเสร็จนำกล่องดังกล่าวไปเก็บไว้ในตู้เพาะที่ปรับอุณหภูมิไว้ระดับ 10, 15, 20, 25, 30, 20-30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงฟลูออเรสเรดเซนต์ หลังจากนั้นสังเกตุความงอกทุกวัน พร้อมทั้งสเปรย์น้ำเป็นครั้งคราว เพื่อรักษาความชื้นภายในกล่องเมื่อเพาะไว้ 10-16 วัน จึงนำมาตรวจสอบความงอก

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาชีพจักรพบว่าเมล็ด *Chenopodium album* ที่ปลูกเดือนมีนาคมงอกหลังจากปลูกได้เฉลี่ย 5.84 วัน ซึ่งงอกช้ากว่าการปลูกในเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายน ซึ่งทั้ง 2 เดือนนี้เฉลี่ยงอกหลังจากปลูกได้ 4.54 และ4.26 วันตามลำดับ *C. album* เป็นพืชที่มีอายุการออกดอกและการบานของดอกไม่พร้อมกัน ภายในช่อดอกเดียวกัน ดังนั้นการสุกแก่ของเมล็ดจึงไม่พร้อมกันด้วย จากการศึกษาพบว่า *C. album* มีอายุการออกดอกชุดแรกของการปลูกเดือน มีนาคม กรกฎาคม และพฤศจิกายน เฉลี่ย 42.40, 45.84 และ 48.16 หลังจากงอกตามลำดับการปลูกเดือนมีนาคม และกรกฎาคม ออกดอกเร็วกว่าการปลูก

เดือนพฤศจิกายน ประมาณ 3-6 วัน จำนวนวันออกดอกชุดสุดท้าย เฉลี่ย 60.86, 85.62 และ 98.02 วัน หลังจากงอกตามลำดับ จึงเห็นได้ว่าการปลูกเดือนพฤศจิกายนนั้นมีจำนวนวันออกดอกยาวนานกว่าการปลูกในเดือนมีนาคม และกรกฎาคม ประมาณ 37.16 และ 12.40 วัน ตามลำดับ สำหรับการสุกแก่ของเมล็ดชุดแรกและเก็บเกี่ยวเมล็ดได้ของการปลูกเดือนมีนาคม กรกฎาคม และ พฤศจิกายน เฉลี่ย 68.32, 77.26 และ 81.12 วัน หลังจากงอกตามลำดับและสามารถเก็บเกี่ยวเมล็ดชุดสุกท้ายเฉลี่ย 98.08, 117.50 และ 132.14 วัน หลังจากงอกตามลำดับ เมื่อเก็บเกี่ยวเมล็ดชุดนี้เสร็จแล้วต้นก็แห้งตายไป แสดงว่า *C. album* เป็นวัชพืชล้มลุกฤดูเดียว (Holm *et al.,* 1977) การปลูกเดือนพฤศจิกายนจะมีอายุยาวนานที่สุด ตั้งแต่งอกจนเมล็ดแก่ เฉลี่ย 132.14 วัน รองลงมาคือการปลูกเดือนกรกฎาคม เฉลี่ย 117.50 วัน และการปลูกเดือนมีนาคม อายุสั้นที่สุด เฉลี่ย 89.08 วัน (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่าชีพจักรของ *C. album* จะแตกต่างกันไปตามฤดูที่ปลูกซึ่งตรงกับรายงานของ Holm *et al.,* (1977)

การศึกษาด้านการเจริญเติบโตและการแพร่พันธุ์ ผลปรากฏว่าการปลูกเดือนมีนาคมต้นสูงเฉลี่ยต่อต้น 67.48 เซ็นติเมตร ซึ่งเตี้ยที่สุด ส่วนการปลูกในเดือนกรกฎาคม และพฤศจิกายน มีความสูงเฉลี่ย 121.16 และ 130.60 เซ็นติเมตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความสูงของต้นที่ปลูกเดือนมีนาคม กรกฎาคม และพฤศจิกายน มีความแตกต่างกัน สำหรับจำนวนการแตกกิ่งแขนงต่อต้นของต้นที่ปลูกเดือนมีนาคม มีการแตกกิ่งแขนงน้อยที่สุด เฉลี่ย 26.96 กิ่ง ซึ่งแตกต่างกับการปลูกเดือนกรกฎาคม ซึ่งเฉลี่ยแตกกิ่งแขนง 37.16 กิ่ง และแตกต่างกับการปลูกเดือนพฤศจิกายน ที่มีการแตกกิ่งแขนงมากที่สุด เฉลี่ย 58.20 กิ่ง ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าการปลูกเดือนมีนาคมแล้วเจริญเติบโตในฤดูร้อนอากาศที่ร้อนเกิดไปอาจจะไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตส่วนการปลูกเดือนพฤศจิกายน ฤดูหนาวอากาศอบอุ่นสลับหนาว ซึ่งอาจจะเป็นช่วงที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของ *Chenopodium album* ก็ได้ เนื่องจากพืชดังกล่าวมีถิ่นกำเนิดอยู่ใน เขตอบอุ่นและกึ่งอบอุ่นของโลก (Holm *et al.,* 1977) จำนวนช่อดอกต่อต้นก็เช่นเดียวกันคือการปลูกเดือนมีนาคม วัชพืชชนิดนี้ผลิตช่อดอกน้อยที่สุด เฉลี่ย 60.30 ช่อต่อต้น และแตกต่างกับการปลูกเดือนกรกฎาคม เฉลี่ย 307.82 ช่อต่อต้น ซึ่งแตกต่างกับการปลูกเดือนพฤศจิกายน ซึ่งสามารถผลิตช่อดอกได้มากที่สุด เฉลี่ย 468.34 ช่อ ต่อต้น เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเมล็ดต่อช่อพบว่าต้นที่ปลูกเดือนมีนาคมมีการผลิตเมล็ดต่อช่อน้อยที่สุด เฉลี่ย 12.08 เมล็ด ซึ่งแตกต่างจากการปลูกเดือนพฤศจิกายน ที่สามารถผลิตเมล็ดต่อช่อได้มากที่สุดเฉลี่ย 16.36 เมล็ดต่อช่อรองลงมาการปลูกเดือนกรกฎาคม เฉลี่ย 15.10 เมล็ดต่อช่อ ในทำนองเดียวกันการผลิตเมล็ดต่อต้นที่ปลูกเดือนมีนาคมผลิตเมล็ดได้น้อยที่สุด เฉลี่ย 632.96 เมล็ด ส่วนการปลูกเดือนพฤศจิกายนนั้นสามารถผลิตได้มากที่สุด เฉลี่ย 5,917.07 เมล็ดต่อต้น รองลงมาคือการปลูกเดือน กรกฎาคม ผลิตเมล็ดได้ เฉลี่ย 3,800.52 เมล็ดต่อต้น และเดือนมีนาคมผลิตเมล็ดได้ เฉลี่ย 632.96 เมล็ดต่อต้น (ตารางที่ 2) แต่อย่างไร ก็ตาม *C. album* ก็สามารถขึ้นเจริญเติบโตได้ทุกเดือนหรือทุกฤดูที่ปลูก แสดงให้เห็นว่าวัชพืชชนิดนี้สามารถปรับตัวได้อย่างกว้างขวาง (Holm *et al.,* 1977)

ความงอกที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ผลการศึกษาความงอกที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน ผลปรากฏว่าในระดับอุณหภูมิสลับที่ 20-30 องศาเซลเซียส จะมีการงอกของเมล็ด *Chenopodium album* สูงสุด

เฉลี่ย 89.8% เมื่อ 10 วันหลังจากเพาะรองลงมาคือระดับอุณหภูมิ 25, 20, 30, 25 และ 15 องศาเซลเซียส จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกเฉลี่ย 77.5%, 67.3%, 61.0%, 8.0% และ 6.5% ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองในประเทศแคนาดาพบว่าที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของ *C. album* (Holm *et al.,* (1977) ส่วนในระดับอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส เมล็ดไม่สามารถงอกได้ในระดับอุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส จะมีเปอร์เซ็นต์การงอกปานกลางแตกต่างกัน ส่วนระดับอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส มีความงอกไม่แตกต่างกันแต่มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ และต้องใช้เวลาในการงอกนานถึง 16 วัน ในขณะที่ระดับอุณหภูมิ อื่นสามารถงอกได้ 10 วัน หลังจากเพาะเมล็ด แต่อย่างไรก็ตาม *C. album* สามารถ งอกได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15-30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) ซึ่งในช่วงอุณหภูมิ ดังกล่าวเป็นระดับอุณหภูมิในแต่ละภาคของประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคเหนือจะมีภูมิอากาศที่เหมาะสมกว่าภาคอื่นๆ เพราะฉะนั้นก็มีความเสี่ยงพอสมควรถ้าเมล็ด *C. album* ปะปนกับเมล็ดพืชปลูกแล้วไปงอกในที่ดังกล่าว นอกจากนี้จากการรายงานของ Holm *et al.,* 1977 พบว่า *C. album* สามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในระดับอุณหภูมิต่างๆ กันได้

สรุปผลการศึกษา

การปลูก *Chenopodium album* ซึ่งเป็นวัชพืชต่างประเทศที่สำคัญนั้น จากการที่ได้ปลูกทั้ง 3 ฤดู โดยการปลูกเดือนมีนาคม เป็นตัวแทนฤดูร้อน ปลูกเดือนกรกฎาคมแทนฤดูฝน และการปลูกเดือนพฤศจิกายนแทนฤดูหนาว พบว่าการปลูกช่วงฤดูร้อนจะมีวงจรชีวิตที่สั้นที่สุด การปลูกฤดูหนาวจะมีวงจรชีวิตยาวนานที่สุด และรองลงมาการปลูกฤดูฝนด้านการเจริญเติบโตและการแพร่พันธ์ก็เช่นเดียวกัน กล่าวคือฤดูร้อนจะมีการเจริญเติบโตและการแพร่พันธุ์น้อยกว่าการปลูกในฤดูฝนและฤดูหนาว จะเห็นได้ว่าการปลูกทั้ง 3 ฤดูดังกล่าว *C. album* ก็สามารถผลิตเมล็ดต่อต้นได้มากที่เดียว แม้ว่าในแต่ละฤดูจะมีการผลิตเมล็ดที่แตกต่างกันก็ตาม แสดงให้เห็นว่าถ้าเมล็ดวัชพืชดังกล่าวเล็ดรอดปะปนเข้ามาก็สามารถปรับตัวได้ดีก็อาจจะมีโอกาสแพร่ระบาดเข้าไปในแหล่งปลูกพืชต่างๆ ได้เช่นกัน ส่วนการศึกษาความงอกที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ พบว่า *C. album* สามารถงอกได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส แต่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกมากที่สุดคือ ที่ระดับอุณหภูมิสลับ 20-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากในระดับอุณหภูมิดังกล่าว *C. album* มีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงสุด ส่วนในระดับอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส เมล็ดจะไม่สามารถงอกได้ จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบศักยภาพในการงอก การเจริญเติบโต การแพร่พันธุ์ และระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกด้วย ดังนั้นข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาทั้งหมดจะเป็นแนวทางที่สำคัญนำไปประกอบการพิจารณาประเมินความเสี่ยงและกำหนดมาตรการทางกฎหมายกักกันพืช ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชจากต่างประเทศ โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์ผัก ทั้งนี้เพื่อลดโอกาสหรือความเสี่ยงที่เมล็ดวัชพืชชนิดนี้เล็ดรอดเข้ามาแพร่ระบาดทำความเสียหายให้แก่พืชปลูกภายในประเทศในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

นงพร มาอยู่ดี และ สมบูรณ์ เจริญฤทธิ์ 2539. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดวัชพืชจากต่างประเทศ, รายงานผลการทดลองและวิจัยปี 2539 กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, กรมวิชาการเกษตร 10 หน้า

วิยดา เทพหัตถ์ถี 2523. พจนานุกรมศัพท์พฤกษศาสตร์ สาขาพฤกษศาสตร์ อนุกรมวิธาน คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร. 206 หน้า

Hanf, M. 1983. The Arable Weeds of Europe with their Seed lings and Seeds. UK BASF United Kingdom Ltd. Suffolk, UK. 494 pp.

Holm, G.L.,D.L. Plucknett, J.V. Pancho and J. P. Herberger. 1977. The World's Worst Weeds, Distribution and Biology. The University press of Hawaii, Honolulu. 609 pp.

Shearer, A.R. 1974. Weed Seeds, Ministry of Agriculture and Fisheries, Bulletin No. 316, Government Printing Office, Wellington, New Zealand. 56 pp.

Williams, I.T. 1963. Biological flora of the British Isles: *Chenopodium album* L. J. Ecol. 51(3) : 711-723

ตารางที่ 1. การเจริญเติบโตของ *Chenopodium album* L.ที่ปลูกในระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ พ.ศ. 2545-2546

ระยะเวลาปลูก	จำนวนวันงอก	จำนวนวันออกดอกชุดแรก	จำนวนวันออกดอกชุดสุดท้าย	จำนวนวันการแก่ของเมล็ดชุดแรก	จำนวนวันการแก่ของเมล็ดชุดสุดท้าย
กรกฎาคม	4.54	45.84	85.62	77.26	117.50
พฤศจิกายน	4.26	48.16	98.02	81.12	132.14
มีนาคม	5.84	42.40	60.86	68.32	89.08

ตารางที่ 2. การแพร่พันธุ์ของ *Chenopodium album* L.ที่ปลูกในระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ พ.ศ. 2545-2546

ระยะเวลาปลูก	ความสูงของต้น (ซ.ม.)	จำนวนแตกกิ่งแขนง	จำนวนช่อ/ต้น	จำนวนเมล็ด/ช่อ	จำนวนเมล็ด/ต้น
กรกฎาคม	121.16	37.16	307.82	15.10	3,800.52
พฤศจิกายน	130.60	58.20	468.34	16.36	5,917.07
มีนาคม	67.48	26.96	60.30	12.08	632.96

ตารางที่ 3. เปอร์เซ็นต์การงอกปกติของเมล็ด *Chenopodium album* L. ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

ระดับอุณหภูมิ (^{o}C)	ความงอกปกติของเมล็ด(%) [1/]
10	0.0 f
15	6.5 e
20	67.3 c
25	77.5 b
30	61.0 d
20–30	89.8 a
35	8.0 e
40	0.0 f

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามหลังด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์แบบ DMRT

การพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านต้านทานไวรัสจุดวงแหวนมะละกอโดยเทคนิคการถ่ายยีน

Improvement of Cucumber Varieties for Papaya Ringspot Virus Resistance by Gene Transfer Techniques.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2] และ เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์[1]

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (ยีน CP) ของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV-W) เข้ากับ พลาสมิดพาหะ p2311 ซึ่งเป็น binary vector ได้พลาสมิด p23W1 ซึ่งมีขนาด 10.4 กิโลเบส ประกอบด้วย ยีน CP ของ PRSV-W ขนาด 876 คู่เบส NPT II (ยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน) CaMV 35S promoter และ NOS terminator ซึ่งใช้เป็นพาหะในการนำยีน CP เข้าสู่ embryogenic callus ของแตงพันธุ์เจ็ดใบและพันธุ์ผลเล็กด้วยเครื่องยิงอนุภาค สูตรอาหารสังเคราะห์ที่เหมาะสมในการชักนำให้ยอดอ่อนและลำต้นของแตงพัฒนาเป็น embryogenic callus คือ EVB_5 (MS media ที่เติม 2,4-D 2.2 มิลลิกรัม BAP 0.3 มิลลิกรัม myo-inositol 1 กรัม และ stock B_5 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร) จากการตรวจสอบยีน CP ของ PRSV-W ในแตงดัดแปรพันธุกรรมแต่ละต้น (สายพันธ์) ที่ผ่านการคัดเลือกในอาหารสังเคราะห์ EVB_5 ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินผสมอยู่ และพัฒนาเป็นต้นแตงที่สมบูรณ์ในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction พบว่า แตงดัดแปรพันธุกรรมของพันธุ์เจ็ดใบ 35 สายพันธุ์ จากจำนวน 57 สายพันธุ์ มียีน CP ขนาด 876 คู่เบส หลังจากการทดสอบความต้านทานของต้นแตงเหล่านี้ต่อไวรัส PRSV-W โดยวิธีกลและโดยเพลี้ยอ่อนยาสูบเป็นพาหะในเรือนทดลอง ปรากฏว่า แตง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ No. 4 No. 8 No. 25 และ No. 32 มีแนวโน้มที่มีความต้านทานต่อไวรัส PRSV-W เมล็ดพันธุ์ที่ได้จากการผสมตัวเองของสายพันธุ์ No. 4 No. 25 และ No. 32 ส่วนใหญ่จะลีบไม่สมบูรณ์ แต่สายพันธุ์ No. 8 ให้เมล็ดที่ค่อนข้างสมบูรณ์

รหัสทะเบียนวิจัย 44 35403 002 และ 46 35403 001

คำนำ

แตงกวาและแตงร้าน (cucumber, *Cucumis sativus*) เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพื่อใช้บริโภคภายในประเทศและเพื่อการส่งออก สามารถปลูกได้ในทุกภาคของประเทศ พื้นที่เพาะปลูกในปี 2540 / 2541 ของแตงกวา 131,360 ไร่ ได้ผลผลิตรวม 205,365 ตัน สำหรับแตงร้านมีพื้นที่ปลูก 45,049 ไร่ และผลผลิต 101,552 ตัน การส่งออกของแตงกวาและแตงร้าน ในรูปผักสด แบบแช่น้ำเกลือและในรูปผักดองน้ำส้ม มีปริมาณ 892 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่ารวม 43.7 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2540/2541) แต่พื้นที่เพาะปลูก ผลผลิตและปริมาณการส่งออกลดลงจากในปี 2537/2538 ซึ่งมีพื้นที่ปลูกแตงกวา 158,547 ไร่ ผลผลิตรวม 268,113 ตัน และพื้นที่ปลูกแตงร้าน 170,155 ไร่ ผลผลิตรวม 293,654 ตัน และปริมาณการส่งออกโดยรวม 2,754 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 70.5 ล้านบาท (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2437/2538) และในปี 2546/47 พบว่า พื้นที่เพาะปลูกของแตงกวาลดลงเหลือเพียง 90,492 ไร่ ได้ผลผลิตรวม 141,474 ตัน สำหรับแตงร้านมีพื้นที่ปลูก 42,488 ไร่ และผลผลิต 93,061 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร , 2546/2547) สาเหตุหนึ่งที่เป็นปัญหาและอุปสรรคสำคัญต่อการปลูกแตง คือโรคที่เกิดจากไวรัส พบว่ามีไวรัสหลายชนิดสามารถระบาดและทำความเสียหายให้กับแตงกวา /แตงร้าน เช่น *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Squash mosaic virus* (SqMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) จากการสำรวจโรคที่เกิดจากไวรัสในพืชตระกูลแตง ปรากฏว่าไวรัสที่พบมากที่สุดในแตงกวา แตงไทย บวบเหลี่ยม มะระจีน ฟักเขียวและฟักทอง คือ ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ ซึ่งพบระบาดมากในภาคใต้ รองลงมาคือ ภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (เครือพันธุ์ และคณะ, 2535)

PRSV จัดอยู่ใน genus *Potyvirus* ของ Family *Potyviridae* มีลักษณะเป็นท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 780 x 12 นาโนเมตร ถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical inoculation) และมีเพลี้ยอ่อนหลายชนิดเป็นพาหะ แบบ non-persistent (ธีระ, 2532) ในปัจจุบัน PRSV แบ่งเป็น 2 ชนิด (type หรือ strain) คือ PRSV-P และ PRSV-W โดย PRSV-P ทำให้เกิดโรคทั้งในมะละกอและพืชตระกูลแตง แต่ PRSV-W จะเข้าทำลายเฉพาะพืชตระกูลแตงเท่านั้น PRSV ทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันทางเซรุ่มวิทยา (Purcifull *et al.,* 1984) นอกจากนี้การเรียงตัวของกรดนิวคลีโอไทด์ และ กรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein gene, ยีน CP) ของ PRSV ทั้งสองชนิดมีความคล้ายกัน (Bateson *et al*., 1994) อย่างไรก็ดี มีรายงานระบุว่าถึงแม้ PRSV ชนิดเดียวกันแต่พบในภูมิประเทศต่างกัน จะมีคุณสมบัติทางชีววิทยาและมีความผันแปรของการเรียงตัวของยีนต่างกัน (Bateson *et al.,*1994 ; Chaleeprom, 1998) อาการเด่นชัดบนแตง คือ ใบด่าง บิดเบี้ยว มีตุ่มนูน และผลมักจะบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ถ้าอาการรุนแรงต้นจะแคระแกรน และทำให้ผลผลิตลดลง (ภาพที่ 1) การหลีกเลี่ยงโรคจาก PRSV ในประเทศไทยเป็นไปได้ยากเพราะไวรัสชนิดนี้แพร่ระบาดในอัตราที่สูง (Noda *et al.,* 1993) ในปัจจุบันยังไม่พบวิธีใดที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหรือลดความเสียหายที่เกิดจากไวรัสชนิดนี้ และยังไม่พบว่ามีแตงพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อ PRSVในธรรมชาติ ฉะนั้น

วิธีการหนึ่งที่สามารถควบคุมโรคได้ คือ การปรับปรุงพันธุ์แตงให้มีความต้านทานต่อไวรัส โดยอาศัยเทคนิคพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนและการถ่ายยีนของไวรัสเข้าสู่เซลล์พืช และไม่ทำให้ลักษณะทางการเกษตรของพืชเปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด จึงเป็นแนวทางที่สนใจ

การนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้ต้านทานต่อไวรัสจนประสบผลสำเร็จ โดยอาศัยทฤษฎี " parasite-derived resistance " ของ Sanford และ Johnston (1985) ซึ่งกล่าวไว้ว่า ความต้านทานของพืชต่อเชื้อโรคจะดีที่สุด เมื่อมีการตัดต่อยีนของเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์พืช แล้วทำให้ขบวนการการเป็นเชื้อโรคหยุดชะงัก เนื่องจากยีนของเชื้อทำให้หน้าที่บางอย่างเปลี่ยนแปลงไป ยีนที่นิยมใช้ในขบวนการพัฒนาพันธุ์พืชให้ต้านทานไวรัส ได้แก่ ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP gene) ซึ่งสามารถทำให้ยาสูบต้านทานต่อ เชื้อ TMV (Abel *et al*., 1986) มะละกอพันธุ์ Solo ต้านทานต่อ PRSV-P สายพันธุ์ฮาวาย (Fitch *et al*., 1992) แตงกวาและแตงซูกินี ต้านทานต่อ CMV, PRSV และ ZYMV (Chee,1993 ; Chamberlain *et al.,* 1995) Srithongchai *et al.* (1998) สามารถถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส ของ PRSV-P สายพันธุ์เชียงใหม่ เข้าสู่เซลล์ของแตงร้านพันธุ์เจ็ดใบโดยเครื่องยิงอนุภาค (particle inflow gun) แต่ในสภาพธรรมชาติพบว่า PRSV-W เข้าทำลายพืชตระกูลแตง ในอัตราที่สูงกว่า PRSV-P ฉะนั้นจึงควรมีการพัฒนาพันธุ์แตงกวาและแตงร้านให้ต้านทานต่อ PRSV-W โดยวิธีการถ่าย CP gene ของ PRSV-W ที่พบในประเทศไทยเข้าสู่เซลล์ของแตง ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรค

Chee (1993) ได้พัฒนาพันธุ์แตงกวาต้านทานต่อไวรัสใบด่างแตง (*Cucumber mosaic virus*, CMV) โดยวิธีการถ่าย CP gene ของเชื้อ CMV ด้วยการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ พลาสมิด (plasmid) ที่ใช้ คือ pGA482 ซึ่งเป็น binary vector และมี npt II gene เป็น selectable marker gene ผลปรากฏว่าแตงตัดต่อสารพันธุกรรมหรือแตงดัดแปรพันธุกรรม เมื่อนำมาตรวจหา CP gene และ npt II โดยวิธี Southern blot hybridization และ ELISA และนำมาคัดหาพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ CMV โดยวิธีการปลูกเชื้อแบบวิธีกล (mechanical inoculation) พบแตงบางสายพันธุ์มีความต้านทานต่อไวรัสและจะนำไปปลูกทดสอบในรุ่นลูก (R_1) ต่อไป

Chamberlain และคณะ (1995) ได้นำพลาสมิด pTAB6 ซึ่งเป็น *Agrobacterium* binary vector มี GUS เป็น reporter gene, npt II เป็น selectable marker gene และ CP gene ของ PRSV และ ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) มาทำการฝากยีนเข้าสู่เซลล์ (embryogenic callus) ของแตงกวา และ ซูกีนี โดยใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle gun) แตงกวาและซูกีนีที่ผ่านการคัดเลือกบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินผสมอยู่ สามารถเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ และมีการตรวจหา CP gene และ npt II โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) พืชตัดต่อสารพันธุกรรมเหล่านี้จะนำไปศึกษาความต้านทานต่อ PRSV และ ZYMV .ในเรือนทดลองต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ: เพื่อโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PRSV-W เข้ากับพลาสมิด เพื่อพัฒนาเทคนิคของการถ่ายยีนโปรตีนห่อหุ้มของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอเข้าสู่เซลล์ของแตง และเพื่อสร้างสายพันธุ์แตงตัดต่อสารพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

เป้าหมายของโครงการ คือ ได้พลาสมิดที่มียีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PRSV-W ได้วิธีการที่เหมาะสมในการถ่ายยีนของไวรัสเข้าสู่แตง ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้กับพืชตระกูลแตงชนิดอื่นๆ และได้สายพันธุ์แตงดัดแปรพันธุกรรมที่ต้านทานต่อไวรัสจุดแหวนมะละกอ เพื่อปลูกทดแทนพันธุ์การค้าที่อ่อนแอต่อโรคนี้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่อง DNA sequencer
2. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ
3. ตู้ถ่ายเชื้อ
4. ชั้นสแตนเลสสำหรับวางขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
5. เครื่องยิงอนุภาค
6. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
7. Transluminator
8. เครื่อง electrophoresis
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำและความเร็วสูง
9. โรงเรือนปิดมิดชิด

1. การโคลนยีนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV-W) โดยเริ่มจาก

1.1 การแยกสกัดยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein, CP) ของ PRSV-W จากใบพืชและการสังเคราะห์ cDNA

นำใบน้ำเต้า (squash cv. Black Button) ที่แสดงอาการด่าง หลังได้รับการปลูกเชื้อไวรัส PRSV-W สายพันธุ์นครสวรรค์ ด้วยวิธีกล มาทำการสกัดปริมาณอาร์เอ็นเอ (total RNA, RNAs) โดยใช้ชุด Kit ของ Qiagen (RNA Easy Kit) แล้วนำมาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Superscript Reverse Transcriptase (RT-PCR) เริ่มจากนำ RNAs ที่ได้จากการแยกสกัด 5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 1 ไมโครลิตร 20 μM ของไพรเมอร์ $3UTR_2$ (5’ AGC TCG GAG AAT CTT ACT CTC TTT TTT TTT 3’) 2 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดมาใส่ในเครื่อง heat block ที่ 95 °C นาน 3 นาที แล้วแช่หลอดในน้ำแข็งทันทีอีก 2 นาที นำหลอดมาเติม 5 X Reverse Transcriptase buffer 4 ไมโครลิตร 100 mM DTT 2 ไมโครลิตร RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร Superscript Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันและบ่มที่ 50 °C เป็นเวลา 45 นาที

นำ cDNA มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ใช้ไพรเมอร์ $3UTR_2$ และ $WSCP_1$ (5’ TCT AGA ATG TCC AAA ACT GAA GCT GTG 3’) โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

10 X PCR buffer	5.0	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	2 .0	ไมโครลิตร
20 μM $3UTR_2$	1.0	ไมโครลิตร
20 μM $WSCP_1$	1.0	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.2	ไมโครลิตร
cDNA	5.0	ไมโครลิตร
dH_2O	35.8	ไมโครลิตร
รวม	50.0	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยา PCR รวม 35 รอบ ดังนี้

1. 95 °C 4 นาที 1 รอบ
2. 95 °C 1 นาที, 50 °C 1 นาที, 72 °C 1 นาที 35 รอบ
3. 72 °C 10 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการตัดชิ้น PCR product fragment ขนาด 1,082 คู่เบส (bp) มาแยกให้บริสุทธิ์ ด้วย PCR High Pure Column (Roche)

1.2 การต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

นำ PCR product ที่แยกได้จาก PCR High Pure Column 100 นาโนกรัม มาต่อเชื่อม (ligate) เข้าสู่ พลาสมิดเวคเตอร์ pGEM-T Easy vector (Promega, USA) 50 นาโนกรัม และเติม 10 X Ligation buffer 1 ไมโครลิตร T_4 DNA Ligase 3 unit ปรับปริมาตรให้ได้ 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วบ่มหลอดทดลองที่ 4°C นาน 24 ชั่วโมง

1.3 การ transformation ของ Ligated PCR Product เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* (DH 5α) โดยวิธี Electroporation

เติม 3 M sodium acetate 1 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 30 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ผ่านการ ligate แล้ว และนำมาเก็บที่ –20 °C นาน 30 นาที จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง แล้วละลายตะกอน ดีเอ็นเอในน้ำ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาผสมกับ *E. coli* competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร สำหรับใช้ในการ transformation ด้วยเครื่อง Gene Pulser (Biorad) หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดมาเติม SOC media 800 ไมโครลิตร เขย่าก่อนบ่มที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายใน SOC media 50 ไมโครลิตร และเทแผ่ลงบนอาหารแข็ง 2xYT Agar (ที่มี X-Gal 80 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, IPTG 60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

1.4 การสกัดโคลนของพลาสมิด ออกจากเซลล์ของ *E. coli* โดยวิธี Alkaline lysis

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2xYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT (มี ampicillin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37°C ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 150 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 150 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (25 :1) 200 ไมโครลิตร เขย่า และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วย 0.8 เท่าโดยปริมาตรของ Isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2 % ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °C นาน 30 นาที

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจดูขนาดของพลาสมิดและส่วนของยีน CP ที่โคลนเข้าไป บน 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำโคลนมาตัดด้วย เอ็นไซม์ *Eco*RI (1 ยูนิคของ *Eco*RI/ 1ไมโครกรัม ของ พลาสมิด) และตรวจสอบซ้ำด้วยเทคนิค PCR ใช้ ไพรเมอร์ $3UTR_2$ และ $WSCP_1$ ก่อนนำไป sequence เพื่อหาลำดับเบสของ ยีน CP –PRSV ด้วยเครื่อง Sequencer

1.5 โคลนที่มียีน CP ของ PRSV-W นำมาทำการ subclone สำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

โดยใช้ ไพรเมอร์ $WSCP_1$ และ $WSCP_2$ (5’ GAG GAT AAC TAC GCG TTA ACT TCT GAG 3’) มาทำ PCR full-length ของยีน CP โดยใช้โคลนเก่าในพลาสมิด pGEM-T Easy vector เป็น DNA template หลังจากได้ PCR product แล้วนำมาต่อเชื่อม (ligation) และถ่ายเข้าสู่ (transformation) *E. coli* โดยวิธี electroporation (ข้อ 1.2-1.3) ตรวจสอบโคลนโดยการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Xba*I-*Sac*I จะได้ชิ้นของ insert DNA ของยีน CPจากโคลนใหม่ ขนาด 876 คู่เบส จากนั้นทำการแยก fragment นี้ จาก agarose gel และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ High Pure Column แล้วนำมาต่อเชื่อมเข้าในตำแหน่ง *Xba*I-*Sac*I ของเวคเตอร์ p2311 (binary vector จาก ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ขนาด 9.6 กิโลเบส) ในอัตรา เวคเตอร์ 200 นาโนกรัม ต่อ ชิ้น insert ของยีน CP 50 นาโนกรัม และ ถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* (DH 5α) โดยวิธี electroporation คัดเลือกโคโลนีของ พลาสมิดบนอาหาร 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มีกานามัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและทำการตัดพลาสมิดด้วย *Xba* I และ *Sac* I เพื่อตรวจสอบว่าเป็นโคลนที่ถูกต้อง และตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี PCR

2. การพัฒนาระบบและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงสำหรับการถ่ายยีน

นำเมล็ดแตงพันธุ์เจ็ดใบและพันธุ์ผลเล็ก มาฟอกฆ่าเชื้อก่อนเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ โดยแช่เมล็ดใน 1.5% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ pH 7.0 ที่เติมทวีน (tween) 20 ประมาณ 2-3 หยด นาน 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว อีก 3 ครั้งๆละ 3 นาที ทำการย้ายเมล็ดมาเพาะในขวดแก้วขนาด 8 ออนส์ ที่มีอาหาร water agar 0.9% บรรจุอยู่ (วุ้น 9 กรัม/ น้ำ 1 ลิตร) จำนวน 10 เมล็ด / ขวด เก็บไว้ใน

ห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C และมีแสงสว่าง 16 ชั่วโมง/วัน ประมาณ 5-7 วัน เมล็ดจะงอกเป็นต้นอ่อน เลือกตัดเฉพาะบริเวณส่วนยอด (meristem tip) ขนาด 3.0 มิลลิเมตร ใบเลี้ยง (cotyledon) และลำต้น(stem) ยาว 1 เซนติเมตร ของต้นแตง แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ (induction media) สูตรต่างๆที่ใช้ MS (Murashige and Skoog) media เป็นหลัก จำนวน 4 สูตร ได้แก่

1. สูตร EVB_5 (Chamberlain *et al.,* 1995) ประกอบด้วย MS salts (Marashige and Skoog, 1962), 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) 2.2 มิลลิกรัม และ BAP (N^6-Benzylaminopurine) 0.3 มิลลิกรัม , myo-inositol 1 กรัม , วุ้น 9 กรัม , น้ำตาล 30 กรัม และ B_5 stock (nicotinic acid และ pyroxidine HCl อย่างละ 10 มิลลิกรัม, thiamine 100 มิลลิกรัม และ myo-inositol 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) อีก 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร pH 5.8

2. สูตร $MDBB_5$ ประกอบด้วย MS salts (Marashige and Skoog, 1962), 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม และ BAP 1.0 มิลลิกรัม , myo-inositol 1 กรัม , วุ้น 9 กรัม , น้ำตาล 30 กรัม และ B_5 stock (nicotinic acid และ pyroxidine HCl อย่างละ 10 มิลลิกรัม, Thiamine 100 มิลลิกรัม และ myo-inositol 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร) อีก 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร pH 5.8

3. สูตร MDB ประกอบด้วย MS salts (Marashige and Skoog, 1962), 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม และ BAP 1.0 มิลลิกรัม , myo-inositol 1 กรัม , วุ้น 9 กรัม , น้ำตาล 30 กรัม ในปริมาตร 1 ลิตร pH 5.8

4. สูตร $MDNB_5$ ประกอบด้วย MS salts (Marashige and Skoog, 1962), 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม และ NAA (1-Naphthaleneacetic acid) 1.0 มิลลิกรัม , myo-inositol 1 กรัม , วุ้น 9 กรัม , น้ำตาล 30 กรัม และ B_5 stock 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร pH 5.8

โดยเรียงชิ้นส่วนต่างๆของแตงที่ตัดจากต้นอ่อน จำนวน 5 ชิ้น/ จานเลี้ยงเชื้อขนาด 100 x 15 มิลลิเมตร

เปลี่ยนอาหารสังเคราะห์ ทุกๆเดือน จนกระทั่งเซลล์แตงเจริญเป็น embryogenic callus

3. พัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่แตงและทดสอบความต้านทานของแตงที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอในสภาพเรือนทดลอง

ก่อนทำการถ่ายยีน CP เข้าสู่พืชด้วยเครื่องยิงอนุภาค (Bombardment หรือ particle inflow gun) 4 วัน จะต้องย้าย embryogenic callus ของแตงมาวางตรงกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารสังเคราะห์ (induction medium) ใหม่ ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ1 เซนติเมตร

พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองมี 2 ชนิด คือ p23W1 ซึ่งมีขนาด 10,461 คู่เบส (หรือ 10.4 กิโลเบส) ประกอบด้วย ยีน CP ของ PRSV-W, NPT II (ยีนที่สร้างความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน), CaMV 35S promoter และ NOS terminator และ พลาสมิด p2k7 ซึ่งพัฒนาโดย Dr. Marion Bateson จาก

มหาวิทยาลัย Queensland University of Technology ประเทศออสเตรเลีย มีขนาดรวม 7.2 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนที่สำคัญ คือ ยีน GUS (ยีนรายงานผล) และ NPT II

3.1 พัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แตง

(ดัดแปลงจากวิธีของ Sanford *et al.* (1992)

3.1.1 การล้างอนุภาคทองขนาด 1 ไมครอน โดยชั่งมา 120 มิลลิกรัม ผสมกับ absolute ethanol 1 มิลลิลิตร vortex 1 นาที และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เทน้ำใสทิ้งล้าง 3 ครั้ง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อีก 3 ครั้ง โดยใช้น้ำกลั่นครั้งละ 1 มิลลิลิตร vortex 1 นาที และหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที จากนั้นเติม 50 % glycerol (ฆ่าเชื้อแล้ว) 1 มิลลิลิตร จะได้อนุภาคทองที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แบ่งใส่ในหลอด microtube หลอดละ 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ – 20 °C

3.1.2 ฉาบอนุภาคทองด้วยดีเอ็นเอ คือ p23W1 และ P2K7 โดยนำส่วนผสมของทอง – glycerol 25 ไมโครลิตร มา vortex 10 วินาที แล้วเติมดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม vortex อีกครั้ง ก่อนเติม 2.5 M $CaCl_2$ 25 ไมโครลิตร และ 0.1 M spermidine 5 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน วางในน้ำแข็ง 5 นาที แล้ว vortex อีก 1 ครั้ง ก่อนนำไปวางในน้ำแข็งอีก 10 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำใสทิ้ง 22 ไมโครลิตร

3.1.3 vortex อนุภาคทองที่เคลือบด้วยดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว รีบดูดมา 4 ไมโครลิตร ใส่ตรงกลาง screen ของ millipore หรือที่เรียกว่า swinney และนำไปบรรจุในเครื่องยิงอนุภาคซึ่งประกอบเองที่มหาวิทยาลัย Queensland University of Technology

3.1.4 วางจาน embryogenic callus ของแตง ภายใต้จุดที่ยิง 13.5 เซนติเมตร และใช้แรงดันจากก๊าซฮีเลี่ยม 600 kPa ภายใต้สภาพสูญญากาศ

3.1.5 หลังการยิงยีนแล้ว เก็บ embryogenic callus ไว้ที่ 25 °C นาน 2 วัน

3.1.6 นำ embryogenic callus ที่ได้รับการถ่ายยีนของ P2K7 มาทำการตรวจสอบการแสดงออกของGUS โดยแช่ในสารละลาย X-gluc บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

3.2 การคัดเลือก embryogenic callus หลังได้รับการถ่ายยีน

3.2.1 หลังจากยิงยีนเข้าสู่เซลล์แตงแล้ว 2 วัน ย้าย embryogenic callus ลงในอาหาร EVB_5 ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ผสมอยู่ในอัตรา 100 มิลลิกรัม/ลิตร และทำการย้าย callus ลงในอาหารสูตรเดิมอีก 2 ครั้ง ทุก ๆ 4 สัปดาห์ เก็บไว้ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ 25 °C

3.2.2 จากนั้นย้ายลงในอาหาร EVB_5 ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 25 มิลลิกรัม/ลิตร อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งต่างกัน 4 สัปดาห์ หรือเมื่อ callus แตงเริ่มเจริญเป็นต้นอ่อน

3.3 การเลี้ยง embryogenic callus ให้เจริญเป็นต้น

3.3.1 เมื่อ embryogenic callus ของแตงเริ่มเจริญเป็นตุ่มสีเขียว จะย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน (MS salts วุ้น 9 กรัม และ น้ำตาล 30 กรัม ในปริมาตร 1 ลิตร pH 5.8)

3.3.2 เปลี่ยนอาหารใหม่ ทุก 4 สัปดาห์ จนกระทั่งเจริญเป็นต้นที่มีใบ และราก

3.3.3 เมื่อแตงแต่ละต้น (สายพันธุ์ หรือ line) สูงประมาณ 6-8 ซ.ม. จะนำมาตัดเป็นท่อนๆ โดยแต่ละท่อนจะมีตาข้างหรือตายอด 1 ตา แล้วนำไปเลี้ยงให้เจริญเป็นต้นแตงที่สมบูรณ์ ในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน

3.3.4 เมื่อแตงแต่ละสายพันธุ์เจริญเป็นต้นสมบูรณ์ จะทำการย้ายปลูกลงในดินผสมที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และคลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อให้ต้นแตงปรับตัวเข้ากับสภาพเรือนทดลองที่มีอุณหภูมิประมาณ 25-27 °C (acclimatisation) นาน 7 วัน

3.4 การคัดเลือกต้นแตงที่ได้รับถ่ายยีน

ตรวจสอบการปรากฏผลของยีนโปรตีนห่อหุ้มของ PRSV บนโครโมโซมพืชโดยใช้เทคนิค PCR ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle *et al.* (1990) คือ

3.4.1 บดใบแตงจำลองพันธุ์ น้ำหนัก ประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ใน 200 ไมโครลิตร ของ CTAB บัฟเฟอร์ [2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) CTAB, 1.4 M NaCl, 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)] ให้ละเอียด

3.4.2 แช่ในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 30 นาที

3.4.3 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.4.4 เก็บน้ำใสส่วนบนมาผสมกับ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และหมุนเหวี่ยงด้วย microcentrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

3.4.5 เก็บส่วนของเหลว มาผสมกับ 0.1 เท่า (โดยปริมาตร) ของ 3 M sodium acetate, pH 5.4 และ 2.5 เท่า (โดยปริมาตร) ของ absolute alcohol

3.4.6 vortex และเก็บไว้ที่ -20 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4.7 ตกตะกอน DNA โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C นาน 15 นาที

3.4.8 เทน้ำใสทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที

3.4.9 ตกตะกอน DNA อีกครั้ง ด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 °C

3.4.10 นำหลอดที่มีตะกอนมาทำให้แห้งในตู้อบแห้งที่ 55 °C จากนั้นจึงละลายตะกอน DNA ด้วย TE บัฟเฟอร์ (pH 8.0) 10 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °C

3.4.11 ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

dNTPS (1.25 mM)	1.6	ไมโครลิตร
10 X PCR buffer	1.0	ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	0.8	ไมโครลิตร
primer 1 (30 *p*mole)	0.2	ไมโครลิตร
primer 2 (30 *p*mole)	0.2	ไมโครลิตร
dH_2O	5.16	ไมโครลิตร
Taq (5 U/µl)	0.04	ไมโครลิตร
DNA (template)	1.0	ไมโครลิตร
รวม	10.0	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ $WSCP_1$ = 5' TCT AGA ATG TCC AAA ACT GAA GCT GTG 3'

ไพรเมอร์ $WSCP_2$ = 5' GAG GAT AAC TAC GCG TTA ACT TCT GAG 3'

ทำปฏิกิริยา PCR รวม 32 รอบ ดังนี้

1. 94 °C 3 นาที 1 รอบ
2. 94 °C 15 วินาที, 45 °C 15 วินาที, 72 °C 30 วินาที 30 รอบ
3. 72 °C 10 นาที 1 รอบ

3.4.12 ตรวจยืนจากปฏิกิริยา PCR โดยวิธี agarose gel electrophoresis ใช้ agarose 1% ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ประมาณ 40 นาที

3.5 การทดสอบความต้านทานของแตงดัดแปรพันธุกรรมต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอในสภาพเรือนทดลอง

นำต้นแตงดัดแปรพันธุกรรม มาทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ PRSV-W โดยวิธีกล และโดยเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) เป็นพาหะ

3.5.1 โดยวิธีกล นำใบฟักทองที่มีเชื้อไวรัส PRSV-W สายพันธุ์นครสรรค์ มาบดใน 0.1 M phosphate บัฟเฟอร์ pH 7.0 และผสมผงซีไรท์ (celite) ในอัตรา 1: 3 (น้ำหนัก:ปริมาตร) จากนั้นทาน้ำคั้นพืชลงบนใบของต้นแตงจำลองพันธุ์ที่มีใบจริง 5-6 ใบ (4-5 ต้น/สายพันธุ์) ล้างใบด้วยน้ำก่อนนำไปเก็บในเรือนทดลอง

3.5.2 โดยเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ นำเพลี้ยอ่อนที่พบทั่วไปในแหล่งปลูกพืชตระกูลแตง ได้แก่ เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*) เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*A. gossypii*) และเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) มาทดสอบประสิทธิภาพในการถ่ายทอดไวรัส PRSV-W บนแตงพันธุ์เจ็ดใบ โดยใช้เพลี้ยอ่อน 10 ตัว/ต้น

และ 10 ต้น/ชนิดเพลี้ยอ่อน ใช้เวลาในการรับเชื้อเพียง 1-2 นาทีและถ่ายทอดเชื้อบนต้นปกติข้ามคืน แล้วเลือกเพลี้ยอ่อนชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการถ่ายทอดโรค (ที่ปลอดเชื้อ) มาอดอาหารในจานเลี้ยงเชื้ออย่างน้อย 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเพลี้ยอ่อนไปวางบนใบฟักทองที่เป็นโรคเพื่อรับเชื้อไวรัส PRSV-W เป็นเวลา 1-2 นาที จากนั้นจึงนำเพลี้ยอ่อนเหล่านี้มาปล่อยบนใบของต้นแตงดัดแปรพันธุกรรม (4-5 ต้น/สายพันธุ์) เพื่อถ่ายทอดเชื้อข้ามคืน ใช้เพลี้ยอ่อน 10 ตัว/ ต้น กำจัดเพลี้ยอ่อนโดยการฉีดพ่นด้วยสารกำจัดแมลงก่อนนำไปเก็บในเรือนทดลองต่อไป

เปรียบเทียบลักษณะอาการบนต้นแตงที่ได้การถ่ายยีนเปรียบเทียบกับต้นแตงที่ไม่ได้ถ่ายยีนเป็นเวลานานอย่างน้อย 30 วัน

3.6 การคัดเลือกต้นแตงต้านทานไวรัส PRSV-W

คัดเลือกต้นที่ไม่แสดงอาการของโรค และต้นที่แสดงอาการช้ากว่าต้นแตงที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มาทำการผสมเกสรโดยใช้ดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจากต้นเดียวกัน เพื่อเก็บเมล็ดและนำไปปลูกทดสอบความต้านทานต่อไวรัสในรุ่นลูกต่อไป

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2543 - มีนาคม 2547

สถานที่ - กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

- หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมด้านพืช วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนของไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV-W)

ปริมาณอาร์เอ็นเอ (RNAs)ของใบน้ำเต้าที่เป็นโรคและใบปกติที่ได้จากการสกัด นำมาสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ $WSCP_1$ และ $3UTR_2$ จากการตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย agarose gel electrophoresis พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 1082 คู่เบส (bp) ในใบพืชที่เป็นโรค (ภาพที่ 2)

การตรวจสอบว่าโคลนต่างๆของพลาสมิดหลังต่อเชื่อมกับ PCR product (1082 คู่เบส) และ transform เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH 5α) โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI พบว่าโคลนที่มีส่วนของยีน CP จะแสดงแถบสีขาวบน agarose gel ขนาดประมาณ 660 คู่เบส (ภาพที่ 3) และนำโคลนเหล่านี้ไปตรวจหาลำดับเบสของยีน CP ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับเบสของยีน CP และ 3'UTR (ภาพที่ 4)

ยีนของไวรัส PRSV-W ที่ต้องการใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช คือ ยีน CP ฉะนั้นต้องทำ subclone เพื่อตัดแยกส่วนของยีน CP (full length) ออกจากยีน 3'UTR ผลปรากฏว่า ได้ full length ของยีน CP ขนาด 876 คู่เบส (ภาพที่ 5) หลังจากต่อเชื่อมเข้าสู่พลาสมิดพาหะ p2311(ขนาด 9.6 กิโลเบส) ต้องตรวจสอบซ้ำว่าโคลนใดมียีน CP โดยเทคนิค PCR (ภาพที่ 6) และตรวจหาลำดับเบสของยีน CP (ภาพที่ 7) จากนั้นตั้งชื่อพลาสมิด

ที่จะนำไปใช้ในการถ่ายยีนว่า p23W1 ซึ่งมีขนาด 10,461 คู่เบส (หรือ 10.4 กิโลเบส) ประกอบด้วย ยีน CP ของ PRSV-W, NPT II (ยีนที่สร้างความต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน) , CaMV 35S promoter และ NOS terminator (ภาพที่ 8)

2. การพัฒนาระบบและสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแตงสำหรับการถ่ายยีน

พบว่า สูตรอาหาร EVB_5 ที่เติม 2,4-D ในอัตรา 2.2 มิลลิกรัม / ลิตร, BAP ในอัตรา 0.3 มิลลิกรัม / ลิตร และ stock B5 10 มิลลิกรัม / ลิตร สามารถชักนำให้ทั้งยอด และลำต้น ของแตงพันธุ์เจ็ดใบและพันธุ์ผลเล็ก เจริญเป็น embryogenic callus ซึ่งมีลักษณะเป็นตุ่มโป่งนูน สีเหลืองใสเป็นมัน ได้ในอัตรา 88% 71% และ 85% 55% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลดีกว่า สูตร MDB ซึ่งไม่ได้เติม stock B_5 (ตารางที่ 1) แสดงว่า stock B_5 ช่วยกระตุ้นให้ส่วนต่างๆของต้นแตงโดยเฉพาะส่วนของยอดอ่อน ให้เจริญเป็น embryogenic callus ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chamberlain *et al*., 1995) สูตร $MDBB_5$ สามารถชักนำให้ยอดอ่อนและลำต้นของพันธุ์เจ็ดใบ เจริญเป็น embryogenic callus ในอัตราสูงใกล้เคียงกับสูตร EVB_5 สำหรับสูตร $MDNB_5$ ที่เติม NAA ในอัตรา 1 มิลลิกรัม / ลิตร 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม / ลิตร และ stock B_5 สามารถชักนำให้ ทั้งยอด ลำต้น และใบเลี้ยง ของแตงพันธุ์เจ็ดใบและพันธุ์ผลเล็ก เจริญเป็น embryogenic callus ได้ในอัตรา 33% 60% 15% และ 78% 72% 50% ตามลำดับ ส่วนใบเลี้ยงของแตงทั้งสองพันธุ์ เจริญเป็น embryogenic callus ได้น้อยกว่าส่วนยอดอ่อนและลำต้น เพราะส่วนใหญ่เจริญเป็นต้นอ่อนและรากใหม่ เพราะฮอร์โมน NAA และ BAP สามารถชักนำให้ใบเลี้ยงเจริญเป็นต้นและรากอ่อนได้ (Chee, 1991) (ภาพที่ 9) แต่ใช้เวลานาน ประมาณ 5-6 เดือนหลังจากเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชบนอาหาร ในขณะที่การเจริญเป็น embryogenic callus จากยอดอ่อนในช่วง 60 วันแรกพัฒนาไปอย่างช้า ๆ และเจริญรวดเร็วขึ้นในช่วงเวลา 80-100 วัน และเลือกใช้สูตรอาหาร EVB_5 ในการเพิ่มปริมาณ embryogenic callus สำหรับใช้ในการถ่ายยีนด้วยเครื่องยิงอนุภาค เพราะ สามารถชักนำให้เกิดการสร้าง embryogenic callus ในแตงทั้งสองพันธุ์ ในอัตราที่สูง

3. พัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่แตงและทดสอบความต้านทานของแตงที่ได้รับการถ่ายยีนต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอในสภาพเรือนทดลอง

3. 1 พัฒนาวิธีการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แตง

ก่อนจะทำการถ่ายยีน 4 วัน ต้องย้าย embryogenic callus มาวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารใหม่ เพื่อให้ได้ callus ของแตงที่ยังอ่อน ผนังบางง่ายต่อการรับยีนจากเครื่องยิงอนุภาค

พลาสมิดที่นำมาใช้ในถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยเครื่องยิงอนุภาคมี 2 ชนิด คือ P2K7 เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS ซึ่งเป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพของวิธีการถ่ายยีน สำหรับพลาสมิด

p23W1 เป็นพาหะในการนำยีน CP ของ PRSV-W เข้าต้นแตงเพื่อให้สร้างความต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ

จากการถ่ายยีนโดยใช้เครื่องยิงอนุภาค พบว่าจำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่มี embryogenic callus ของแตงพันธุ์เจ็ดใบ และพันธุ์ผลเล็ก ซึ่งได้รับยีนจากพลาสมิด p23W1 18 จานจากจำนวน 86 จาน (หรือ 21 %) และ และ 15 จานจากจำนวน 84 จาน (หรือ 18 %) ตามลำดับ สามารถเจริญในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินได้ และในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน GUS หลังจากการถ่ายยีนแล้ว 48 ชั่วโมง จะพบจุดสีน้ำเงินกระจายอยู่ทั่วไปใน embryogenic callus ที่ได้รับจากพลาสมิด P2K7 และมีจำนวนจุดประมาณ 400-1,000 จุด/callus (ภาพที่ 10 A) แสดงว่าเทคนิคที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าพืช มีประสิทธิภาพค่อนข้างสูง และเป็นการยืนยันว่ายีน CP ของ PRSV สามารถเข้าสู่เซลล์แตงได้เป็นอย่างดี มีการสุ่มทดสอบการแสดงออกของยีน GUS อีกครั้ง หลังจากการถ่ายยีนแล้ว 4 เดือน ยังคงพบสีน้ำเงินกระจายอยู่ทั่วเซลล์แตง (ภาพที่ 10 B) แสดงว่ายีน GUS ยังคงสภาพอยู่ในเซลล์พืช จากจำนวน 3/5 ชิ้นของ callus แตงที่ทดสอบ

3.2 การคัดเลือก embryogenic callus หลังได้รับการถ่ายยีน

ในระหว่าง 3 เดือนแรกที่ย้าย embryogenic callus ของพันธุ์เจ็ดใบ มาคัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่ callus ที่ไม่ได้รับยีน NPT II ในพลาสมิด p23W1 จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีขาวซีด ยุบตัวเป็นก้อนเหนียว ๆ และตายในที่สุด บางครั้งเซลล์อาจเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม และไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ส่วน callus ที่ได้รับยีน NPT II ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน จะเริ่มเจริญเป็นยอดสีเขียวอ่อนในช่วงที่ถูกเลี้ยงในอาหาร induction medium ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 25 มิลลิกรัม/ลิตร หรือในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน (ภาพที่ 11A, 11B) แต่ embryogenic callus ของพันธุ์ผลเล็ก มีการพัฒนาเป็นยอดอ่อนช้ามาก ประมาณ 4-5 เดือน

3.3 การเลี้ยง embryogenic callus ให้เจริญเป็นต้น

หลังจากย้าย callus ที่เริ่มมียอดอ่อนไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน พบว่าใช้เวลาในการเจริญเติบโตเป็นต้นแตงที่สมบูรณ์ประมาณ 2 เดือน และเมื่อนำต้นแตงที่มีความสูง 6-8 เซนติเมตร มาตัดขยายพันธุ์ และเลี้ยงในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน พบว่าภายใน 30 วัน ท่อนสั้น ๆ ของแตงแต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญเป็นต้นสมบูรณ์ พร้อมที่จะย้ายลงปลูกในดิน (ภาพที่ 11C) แตงพันธุ์เจ็ดใบสามารถเจริญเป็นต้นสมบูรณ์พร้อมที่จะปลูกลงดิน แต่พันธุ์ผลเล็ก ต้นแคระแกร็นและออกดอกเร็ว (ภาพที่ 12) ทำให้ไม่สามารถนำไปปลูกทดสอบความต้านทานต่อไวรัสในเรือนทดลองได้

3.4 การคัดเลือกต้นแตงที่ได้รับยีน

จากการใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบยีนในแตงดัดแปรพันธุกรรมของพันธุ์เจ็ดใบ (R_0) ที่ได้รับการถ่ายยีน CP จาก พลาสมิด p23W1 พบ ผลผลิต DNA (DNA product) ขนาด 876 คู่เบส ในแตง 35 ต้น จากจำนวน 57 ต้น (ภาพที่ 13) จากนั้นจึงนำแตงเหล่านี้ที่ไปทำการปลูกเชื้อไวรัสเพื่อตรวจสอบความต้านทานของแตงต่อไวรัส ก่อนจะคัดเลือกเฉพาะต้นที่ต้านทานไว้

การตรวจสอบยีน CP บนโครโมโซมแตง เป็นวิธีการที่แสดงให้เห็นว่า มีการถ่ายยีนเป้าหมายเข้าสู่โครโมโซมพืชได้เป็นผลสำเร็จ

3.5 การทดสอบความต้านทานของแตงดัดแปรพันธุกรรมต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอในสภาพเรือนทดลอง

ต้นปกติของต้นแตงพันธุ์เจ็ดใบซึ่งใช้เป็นต้นเปรียบเทียบ เริ่มแสดงอาการหลังการปลูกเชื้อ 8-12 วันทั้งแบบวิธีกล และแบบมีเพลี้ยอ่อนยาสูบเป็นพาหะ โดยใบยอดมีอาการด่างชัดเจน บางครั้งเกิดแถบสีเขียวเข้มตามความยาวของเส้นใบย่อย และใบบิดเบี้ยว ซึ่งคล้ายกับอาการที่แสดงบนแตงดัดแปรพันธุกรรมที่ไม่มีความต้านทานต่อไวรัส เหตุผลที่ใช้เพลี้ยอ่อนยาสูบ เพราะจากการทดลองพบว่า มีอัตราการเกิดโรค 100% ในขณะที่เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย (*A. gossypii*) มีอัตราการเกิดโรค 70% และ 80% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

หลังจากสังเกตลักษณะอาการของโรค ปรากฏว่ามีแตง 4 สายพันธุ์ (R_0) จาก 35 สายพันธุ์ของพันธุ์เจ็ดใบที่ตรวจสอบแล้วว่ามียีน CP อยู่บนโครโมโซมพืช ได้แก่ No. 4 No. 8 No. 25 และ No. 32 ซึ่งมีแนวโน้มว่ามีความต้านทานต่อไวรัส PRSV-W เพราะทุกสายพันธุ์ที่ปลูกเชื้อแบบวิธีกล มีบางต้นแสดงอาการไม่รุนแรง และเกิดหลังจากการปลูกเชื้อแล้ว 1 เดือน บางต้นไม่แสดงอาการของโรคเลย (ภาพที่ 14) สำหรับการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนพบว่า สายพันธุ์ No. 8 ไม่แสดงอาการของโรคบนทุกต้นที่ทำการทดลอง ในขณะที่ No. 4 No. 25 และ No. 32 แสดงอาการของโรคแบบไม่รุนแรง –ไม่แสดงอาการ (ตารางที่ 3) ซึ่งคล้ายคลึงกับการถ่ายยีน CP ของเชื้อ *Tobacco mosaic virus* (TMV) เข้าสู่เซลล์ของยาสูบ และหลังจากปลูกเชื้อ TMV บนยาสูบดัดแปรพันธุกรรม พบว่า พืชแสดงอาการของโรคช้ากว่าต้นปกติ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ cDNA ของยีน CP และ จำนวนของยีน CP (copy gene) ในพืชแต่ละต้น (Abel *et al*., 1986) ส่วนแตง 31 สายพันธุ์ที่เหลือ แสดงอาการใบด่างอย่างรุนแรง หลังจากการปลูกเชื้อทั้งสองวิธี เลือกผสมพันธุ์ (self pollination) เฉพาะต้นที่มีแนวโน้มต้านทานต่อไวรัส แต่เมล็ดพันธุ์ที่ได้ของ สายพันธุ์ No. 4 No. 25 และ No. 32 ส่วนใหญ่จะลีบไม่สมบูรณ์ แต่ สายพันธุ์ No. 8 ให้เมล็ดที่ค่อนข้างสมบูรณ์ (ภาพที่ 15) และจะได้มีการนำเมล็ดของแตงรุ่น R_0 มาปลูกเพื่อทดสอบความต้านทานต่อไวรัส รวมทั้งทำการตรวจสอบยีนบนโครโมโซมแตงจำลองพันธุ์รุ่น R_1 ต่อไป

ตารางที่ 1 การเจริญเป็น embryogenic callus ของส่วนยอดอ่อน ลำต้น และใบเลี้ยง ของแตงพันธุ์เจ็ดใบ และพันธุ์ผลเล็กบนอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ

ชื่อพันธุ์	อัตราการเจริญเป็น embryogenic callus (%)			
	EVB_5 [1]	$MDBB_5$	MDB	$MDNB_5$
พันธุ์เจ็ดใบ				
ยอดอ่อน	88	80	35	33
ลำต้น	71	72	42	60
ใบเลี้ยง	15	10	8	15
พันธุ์ผลเล็ก				
ยอดอ่อน	85	50	44	78
ลำต้น	55	67	21	72
ใบเลี้ยง	35	13	5	50

[1] EVB_5 ประกอบด้วย MS salts 2,4-D 2.2 มิลลิกรัม และ BAP 0.3 มิลลิกรัม myo-inositol 1 กรัม และ B_5 stock 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร

$MDBB_5$ ประกอบด้วย MS salts 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม และ BAP 1.0 มิลลิกรัม myo-inositol 1 กรัม และ B_5 stock 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร

MDB ประกอบด้วย MS salts 2,4-D 1.0 มิลลิกรัม และ BAP 1.0 มิลลิกรัม myo-inositol 1 ในปริมาตร 1 ลิตร

$MDNB_5$ ประกอบด้วย MS salts 2,4-D 0.5 มิลลิกรัม และ NAA 1.0 มิลลิกรัม myo-inositol 1 กรัม และ B_5 stock 10 มิลลิลิตร ในปริมาตร 1 ลิตร

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของการถ่ายทอดไวรัส PRSV-W โดยเพลี้ยอ่อนชนิดต่างๆบนแตงพันธุ์เจ็ดใบ

ชนิดของเพลี้ยอ่อน	% การเกิดโรค
เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*)	75 [1]
เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*)	80
เพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*)	100

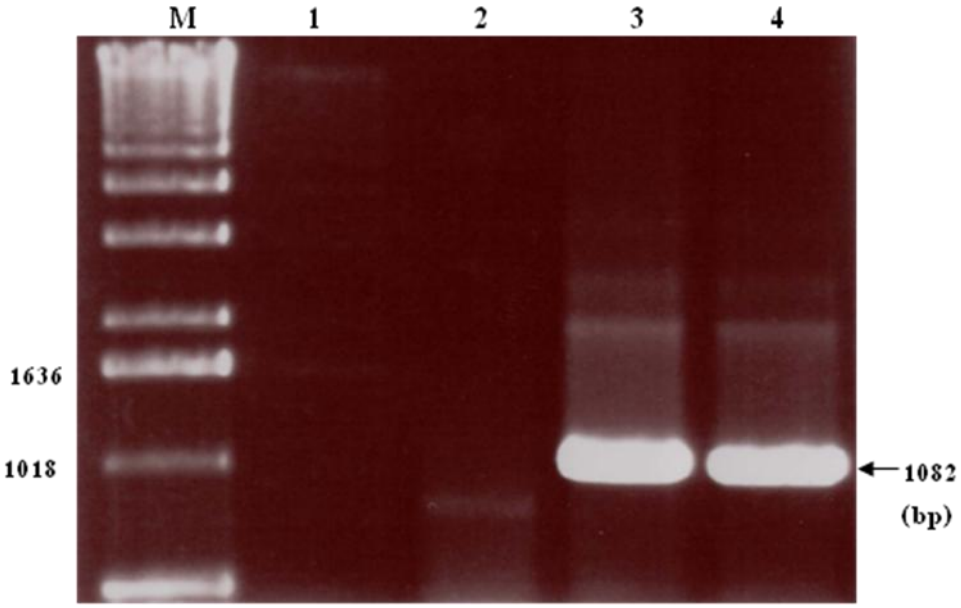
[1] = จำนวนเพลี้ยอ่อน 10 ตัว/ต้น และต้นแตง 10 ต้น/ชนิดของเพลี้ยอ่อน

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบความต้านทานบนสายพันธุ์ของแตงดัดแปรพันธุกรรมพันธุ์เจ็ดใบต่อไวรัส PRSV-W หลังจากได้รับการปลูกเชื้อ แบบวิธีกล และโดยใช้เพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ

จำนวนสายพันธุ์	อาการของโรคหลังการปลูกเชื้อ [1]	
	วิธีกล	เพลี้ยอ่อนเป็นพาหะ
31	อาการรุนแรง	ไม่รุนแรง-ไม่แสดงอาการ
3 (# 4, 25, 32)	ไม่รุนแรง – ไม่แสดงอาการ	ไม่รุนแรง-ไม่แสดงอาการ
1 (# 8)	ไม่รุนแรง –ไม่แสดงอาการ	ไม่แสดงอาการ

[1] = บันทึกลักษณะอาการของโรคตั้งแต่หลังการปลูกเชื้อจนถึง 30 วัน

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการใบด่างของแตงกวาที่เกิดจากไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV-W)

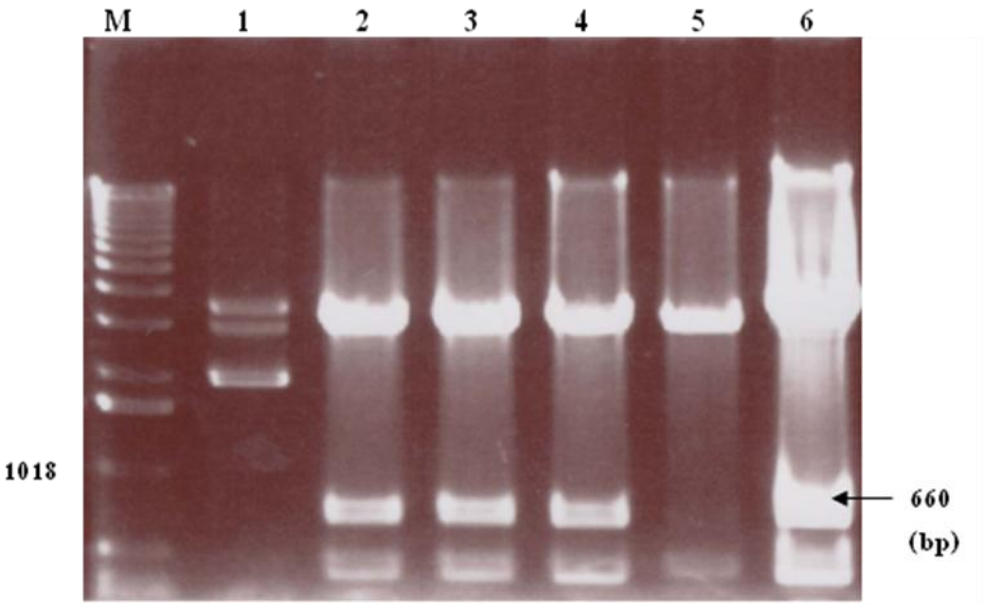


ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอของ cDNA ที่แยกสกัดจากใบพืช และนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ $WSCP_1$ และ UTR_2 วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.07-12.2 กิโลเบส, Boehringer)

1, 2 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพืชปกติ

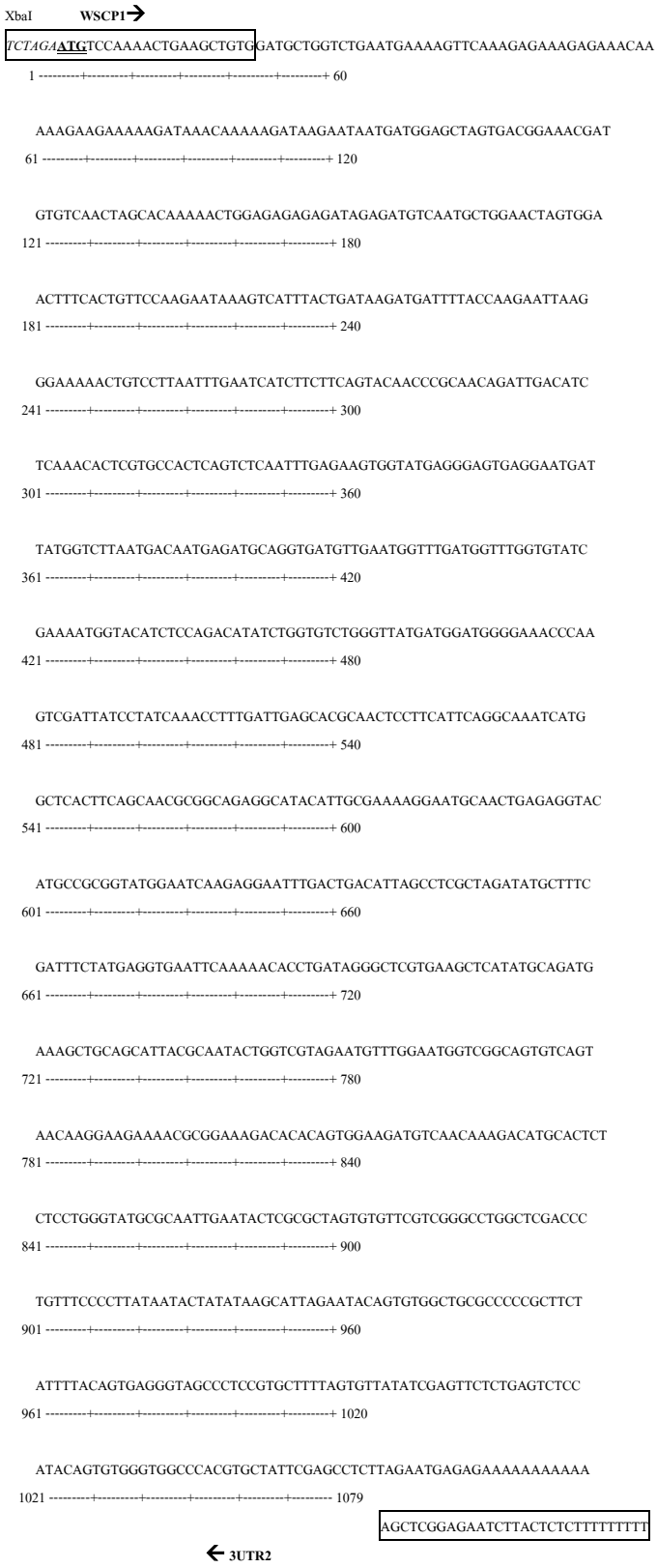
3, 4 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพืชที่เป็นโรค



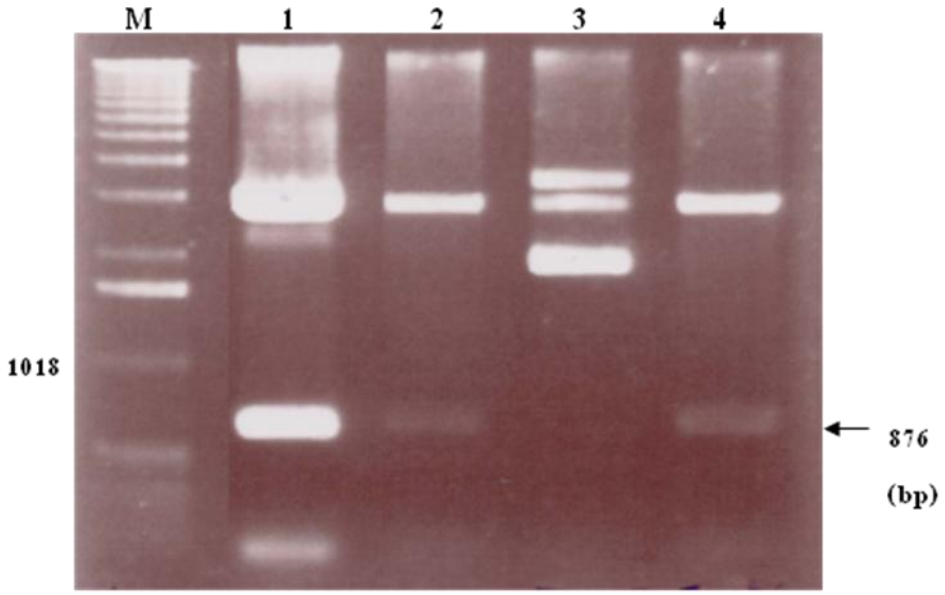
ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (coat protein, CP) ในโคลนต่างๆ ของพลาสมิด pGEM-T หลังจากถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.07-12.2 กิโลเบส, Boehringer)

1-6 = โคลนต่างๆของพลาสมิด pGEM-T ที่เชื่อมต่อกับยีน CP และผ่านการคัดเลือกในอาหาร 2xYT แล้ว โคลนที่มียีน CP คือ No. 2, 3 4 และ 6



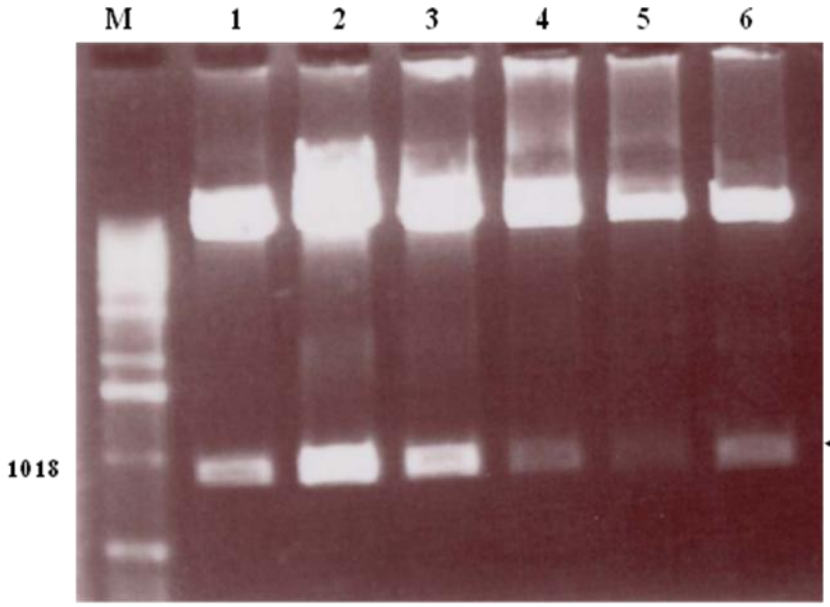
ภาพที่ 4 การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส PRSV-W + 3'UTR



ภาพที่ 5 การตรวจสอบ Full length ของยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (CP) ขนาด 876 คู่เบส (bp) ในพลาสมิด pGEM-T โดยใช้ไพรเมอร์ $WSCP_1$ และ $WSCP_2$ และวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.07-12.2 กิโลเบส, Boehringer)

1-4 = โคลนต่างๆของพลาสมิด pGEM-T ที่เชื่อมต่อกับยีน CP โคลนที่มียีน CP คือ No. 1 2 และ 4



ภาพที่ 6 การตรวจสอบ Full length ของยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (CP) ขนาด 876 คู่เบส (bp) ที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Xba*I-*Sac*I และ subclone เข้าสู่พลาสมิด p2311 (binary vector) และวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.07-12.2 กิโลเบส, Boehringer)

1-6 = โคลนต่างๆของพลาสมิด p2311 ที่เชื่อมต่อกับยีน CP โคลนที่มียีน CP คือ No.1 2 3 4 5 และ 6

TCCAAAACTGAAGCTGTGGATGCTGGTCTGAATGAAAAGTTCAAAGAGAAAGAGAAACAA 60

AAAGAAGAAAAAGATAAACAAAAAGATAAGAATAATGATGGAGCTAGTGACGGAAACGAT 120

GTGTCAACTAGCACAAAAACTGGAGAGAGAGATAGAGATGTCAATGCTGGAACTAGTGGA 180

ACTTTCACTGTTCCAAGAATAAAGTCATTTACTGATAAGATGATTTTACCAAGAATTAAG 240

GGAAAAACTGTCCTTAATTTGAATCATCTTCTTCAGTACAACCCGCAACAGATTGACATC 300

TCAAACACTCGTGCCACTCAGTCTCAATTTGAGAAGTGGTATGAGGGAGTGAGGAATGAT 360

TATGGTCTTAATGACAATGAGATGCAGGTGATGTTGAATGGTTTGATGGTTTGGTGTATC 420

GAAAATgGTACATCTCCAGACATATCTGGTGTCTGGGTTATGATGGATGGGGAAACCCAA 480

GTCGATTATCCTATCAAACCTTTGATTGAGCACGCAACTCCTTCATTCAGGCAAATCATG 540

GCTCACTTCAGCAACGCGGCAGAGGCATACATTGCGAAAAGGAATGCAACTGAGAGGTAC 600

ATGCCGCGGTATGGAATCAAGAGGAATTTGACTGACATTAGCCTCGCTAGATATGCTTTC 660

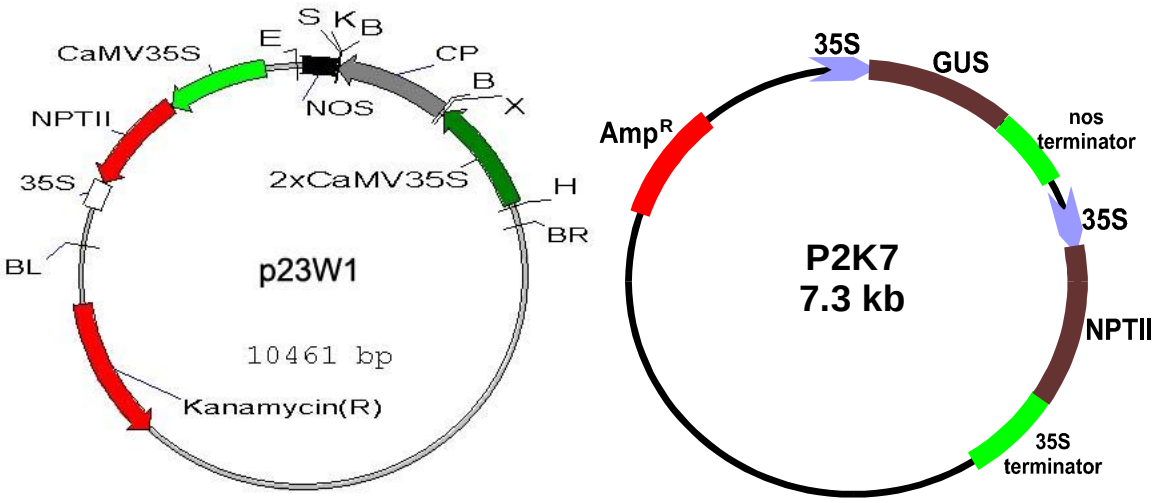
GATTTcTATGAGGTGAATTCAAAAACACCTGATAGGGCTCGTGAAGCTCATATGCAGATG 720

AAAGCTGCAGCATTACGCAATACTGGTCGTAGAATGTTTGGAATGGTCGGCAGTGTCAGT 780

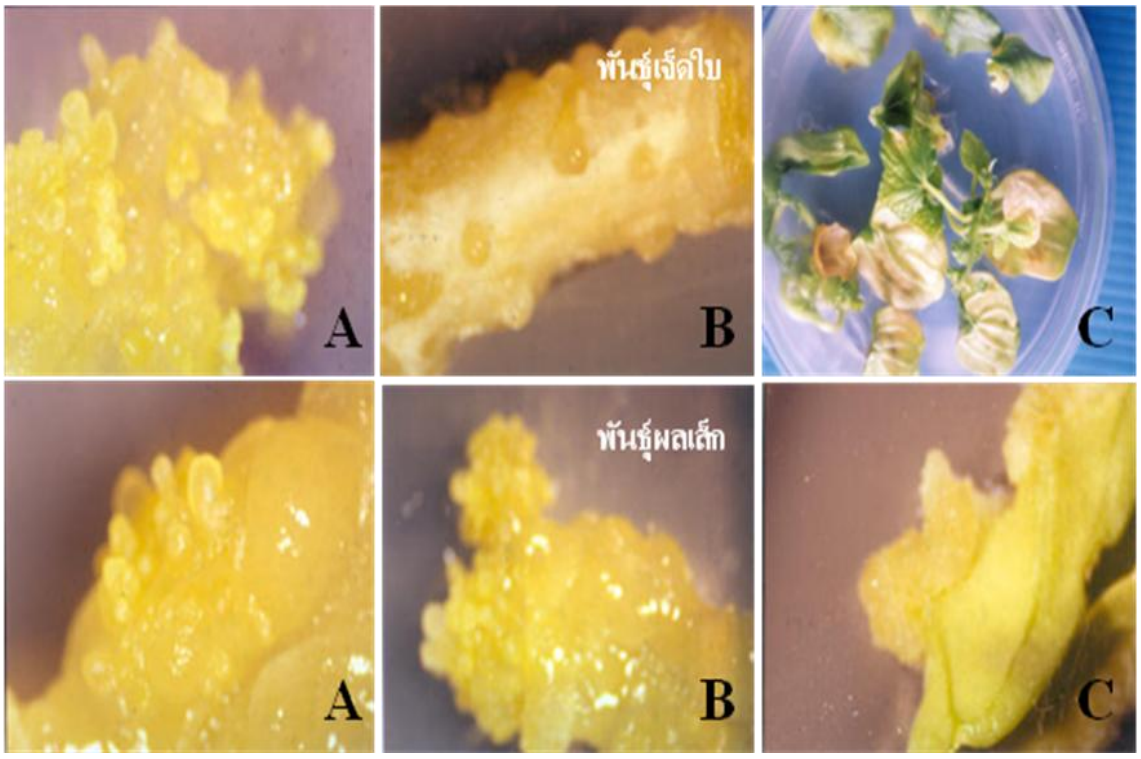
ANCAAGGAAGAAAACGCGGAAAGACACACAGTGGAAGATGTCAACAAAGACATGCACTCT 840

CTCCTGGGTATGCGCAATTGAATACTCGCGCTAGTG

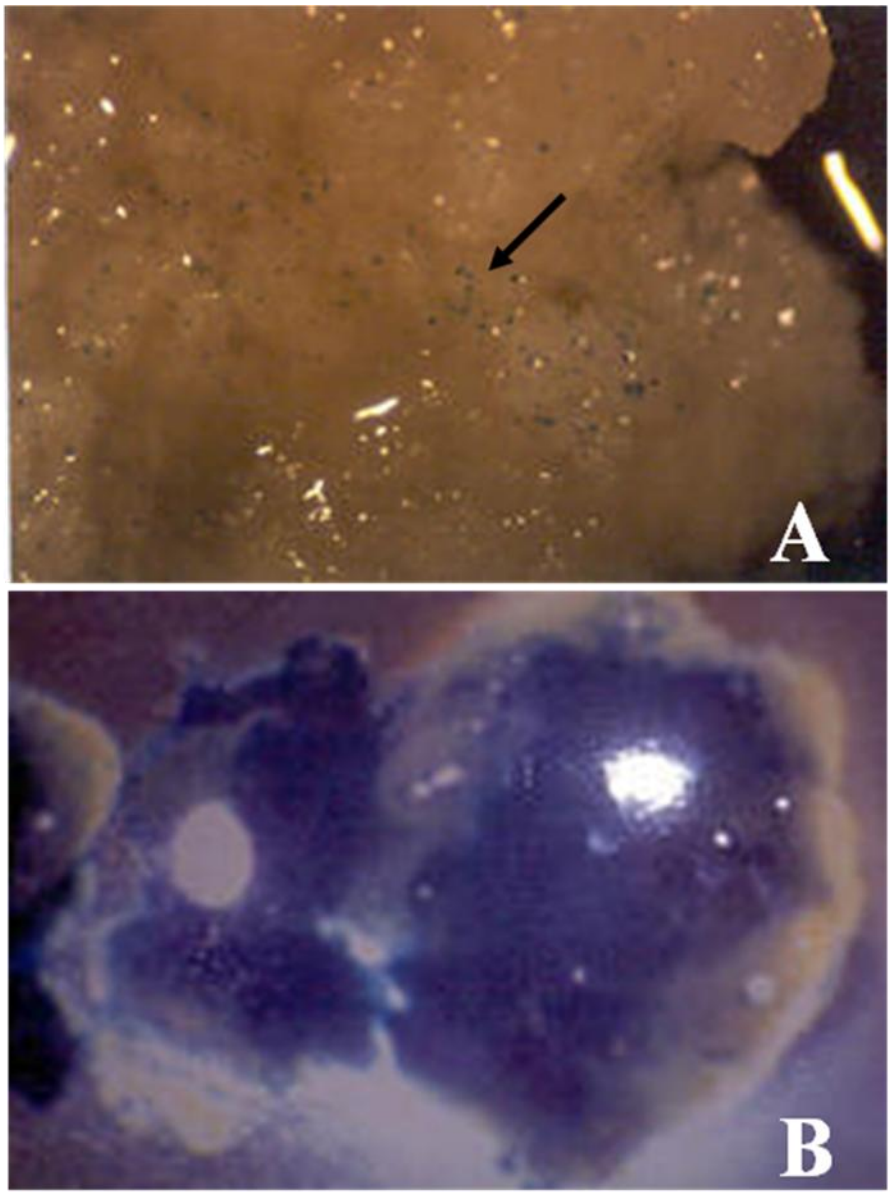
ภาพที่ 7 การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในยีนโปรตีนหุ้มไวรัส (CP gene) PRSV-W มีขนาด 876 คู่เบส



ภาพที่ 8 พลาสมิด 2 ชนิดที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยเครื่องยิงอนุภาค ได้แก่ p23W1 มียีน CP และ NPT II และ p2K7 ที่มียีน GUS และ NPT II



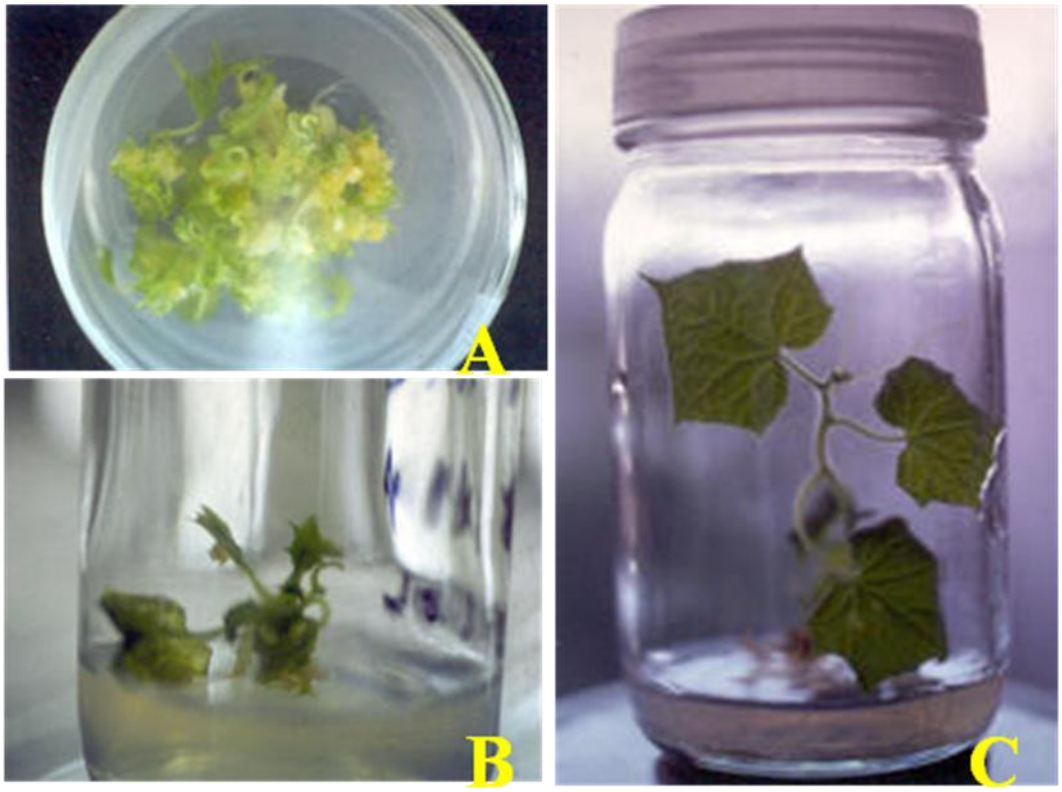
ภาพที่ 9 การเจริญเป็น embryogenic callus ของ (A) ยอดอ่อน (B) ลำต้น (C) ใบเลี้ยง ของแตงพันธุ์เจ็ดใบ และพันธุ์ผลเล็ก ที่เลี้ยงบนอาหาร EVB_5



ภาพที่ 10 GUS-transient expression ของ embryogenic callus ของแตงหลังการถ่ายยีน

(A) 48 ชั่วโมง ปรากฏจุดเล็กๆสีน้ำเงินบน embryogenic callus

(B) 4 เดือน พบเป็นสีน้ำเงินเข้มใน embryogenic callus



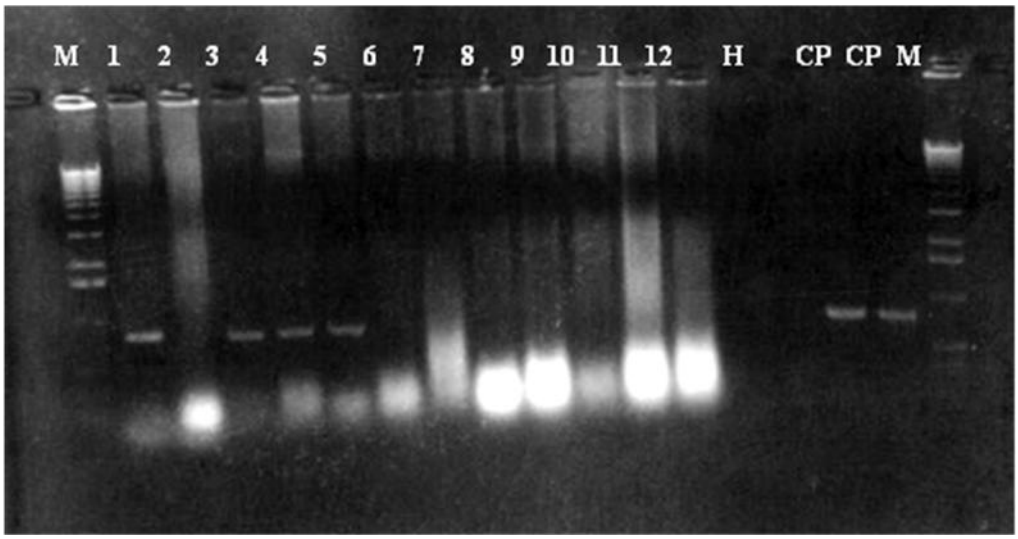
ภาพที่ 11 การเจริญเติบโตระยะต่างๆ ของ embryogenic callus ของแตงพันธุ์เจ็ดใบหลังจากได้รับการถ่ายยีน

(A) เจริญเป็นยอดอ่อนและรากในอาหาร EVB_5 ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน 25 มิลลิกรัม/ลิตร

(B) พัฒนาเป็นต้นและรากในอาหาร MS ที่ไม่มีฮอร์โมน

(C) ต้นแตงที่จะย้ายปลูกลงดิน

ภาพที่ 12 การเจริญเติบโตระยะต่างๆ ของ embryogenic callus ของแตงพันธุ์ผลเล็ก หลังจากได้รับการถ่ายยีน (A) ต้นแคระแกร็น (B) ออกดอกเร็ว



ภาพที่ 13 การตรวจสอบยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส PRSV-W บนโครโมโซมของแตงดัดแปรพันธุกรรม ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ $WSCP_1$ และ $WSCP_2$ และวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (0.07-12.2 กิโลเบส, Boehringer)

1-12 = ดีเอ็นเอของสายพันธุ์แตงดัดแปรพันธุกรรม (พันธุ์เจ็ดใบ)

H = ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพืชปกติ

CP = พลาสมิด p23W1

ภาพที่ 14 เปรียบเทียบลักษณะอาการของโรคบนแตงคัดแปรพันธุกรรม และต้นแตงปกติ หลังได้รับการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

(A) แตงคัดแปรพันธุกรรม ไม่แสดงอาการของโรค

(B) ต้นแตงปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงอาการใบด่าง

ภาพที่ 15 เมล็ดที่ได้จากแตงคัดแปรและไม่แสดงอาการของโรคหลังได้รับการปลูกเชื้อ PRSV-W

(A) สายพันธุ์ No. 4

(B) สายพันธุ์ No. 8

(C) สายพันธุ์ No. 25

(D) สายพันธุ์ No. 32

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสร้างพันธุ์แตงร้านให้ต้านทานต่อไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (PRSV-W) เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อพันธุ์ สำหรับใช้ในการควบคุมโรคและเพิ่มผลผลิต โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมได้แก่ วิธีการถ่ายยีนด้วยการนำยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส PRSV-W สายพันธุ์นครสวรรค์ ตัดต่อเข้าพลาสมิดพาหะ (p23W1) เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชด้วยเครื่องยิงอนุภาค หลังจากการถ่ายยีนแล้ว embryogenic callus ของแตงถูกคัดเลือกในอาหารที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซินผสมอยู่ ใช้เวลาประมาณ 5-8 เดือน callus จึงเริ่มพัฒนาเป็นต้นแตงดัดแปรพันธุกรรม และเมื่อนำแตงเหล่านี้ไปตรวจสอบยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสบนโครโมโซมของแตงด้วยวิธี PCR รวมทั้งการตรวจสอบความต้านทานของแตงรุ่น R_0 ต่อไวรัส PRSV-W พบว่าแตงจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ No. 4 No. 8 No. 25 และ No. 32 มีแนวโน้มต้านทานต่อไวรัส และควรมีการดำเนินการตรวจสอบความต้านทานต่อไวรัสของแตงรุ่น R_1 และ R_2 เพื่อพิสูจน์ว่ายีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส สามารถถ่ายทอดไปสู่แตงรุ่นลูกได้ ถ้าเมล็ดพันธุ์ของแตงเหล่านี้ได้ผ่านการทดสอบว่ามีความต้านทานต่อ PRSV-W ทั้งในเรือนทดลองและในสภาพแปลงปลูก สามารถนำไปขยายพันธุ์เพื่อใช้ปลูกทดแทนพันธุ์แตงที่อ่อนแอต่อ PRSV ในปัจจุบันนี้ได้

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537/38. สถิติการเพาะปลูกพืชทั่วประเทศปีเพาะปลูก 2537/38. ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540/41. สถิติการเพาะปลูกพืชทั่วประเทศปีเพาะปลูก 2540/41. ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546/47. สถิติการเพาะปลูกพืชทั่วประเทศปีเพาะปลูก 2546/47. ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร.

กรมส่งเสริมการเกษตร . 2541. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกพืชผัก . ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ Chiyoicho Noda พัน อินทร์จันทร์ นวลจันทร์ ดีมา และ ลักษณา วรรณภีร์. 2535. การกระจายของไวรัสพืชตระกูลแตงในประเทศไทย . รายงานผลการวิจัย พ.ศ. 2535 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 28-36.

Abel, P.P, R.S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S.G. Rogers, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay of Disease Development in Transgenic Plants That Express the Tobacco Mosaic Virus Coat Protein Gene. *Scince* 232 : 738-743.

Bateson, M.F., J. Henderson, A.J. Gibbs and J.L Dale . 1994. Papaya ringspot potyvirus:isolate variability and the origin of PRSV-P (Aust.). *Journal of General Virology* 75: 3547-3553.

Chaleeprom, W. 1998. Genome analysis of papaya ringspot potyvirus and a related virus. Ph.D Thesis, Queensland University of Technology, Brisbane 178 pp.

Chamberlain, D.A., S. Hekmeijer, C.P. Higgins, M. Bateson and J.L. Dale 1995. Three transgenic zucchini cultivars and transgenic cucumber. Page 42. *In Conference of the Australian Society of Plant Physiologists and New Zealand Society of Plant Physiologists 1995*. (Abstr.)

Chee, P.P. 1991. Plant Regeneration from Cotyledons of *Cucumis melo* 'Topmark'. *HortScience* 26 (7): 908-910.

Chee, P.P. 1993. Transformation in cucumber (C*ucumis sativus* L.) Biotechnology in Agriculture and Forestry vol. 23. Pages 215-227. Plant Protoplasts and Genetic Engineering IV (ed. by Y.P.S. Bajaj).

Debeaujon, I and M. Branchard. 1993. Somatic embryogenic in *Cucurbitaceae. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34 : 91-100.

Doyle, J.J., J.L. Doyle and L.H.B. Hortorium. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 (1) : 13-15.

Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom and J.C. Sanford. 1992. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technology* 10: 1466-1472.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

Purcifull, D., J. Edwardson, E. Hiebert and D. Gonsalves. 1984. Papaya Ringspot Virus. CMI/AAB Descriptions of Plant viruses No. 292 (No 84 revised). 8pp.

Sambrook, J., E . Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory Manual (Book 1) Pages 1.25-1.30. 2 nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.

Sanford, J.C. and S.A. Johnston. 1985. The concept of Parasite-Derived Resistance -Deriving Resistance Genes from the Parasite's Own Genome. *Journal of Theor. Biol.* 113: 395-405.

Sanford, J.C., F.D. Smith and J.A. Russell. 1992. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217: 483-509.

การพัฒนาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* spp. สายพันธุ์ไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

Development of a Thai Entomopathogenic Nematode Strain, *Steinernema* spp. for Insect Pest Control

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1/]
พรพิมล อธิปัญญาคม[2/] และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[3/]
Nuchanart Tangchitsomkid
Pornpimol Athipanyakom and Nuttima Kositcharoenkul

[1/]กลุ่มงานไส้เดือนฝอย [2/]กลุ่มงานวิทยาไมโค [3/]กลุ่มงานบักเตรีวิทยา
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย กำหนดรหัสเป็นอักษรย่อภาษาอังกฤษ 2 ตัว ตามชื่อจังหวัดที่พบคือ KB PC AY KS MK KK NK SK NN RE และ UB code นำมาเก็บในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง ทำการรักษาความมีชีวิตและคงศักยภาพในการเป็น bio-pesticide เก็บรวบรวมไว้ ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช เพื่อการวิจัยและพัฒนาไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร ไส้เดือนฝอย 11 รหัส นำมาแบ่งแยกชนิดและจัดกลุ่มในเบื้องต้นโดยใช้เทคนิคการผสมข้ามกับไส้เดือนฝอยที่จำแนกชนิดแล้ว สามารถจัดแบ่งได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 : KS MK KK NK NN RE และ KB (*S. thailandense*) กลุ่มที่ 2 : AY กลุ่มที่ 3 : SK และกลุ่มที่ 4 : UB ส่วน PC จำแนกเป็น *S. carpocapsae* ไส้เดือนฝอยแต่ละกลุ่มนำมาตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์โดยใช้วิธีทางอณูชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากผล RFLP pattern ของดีเอ็นเอ สามารถแบ่งแยกชนิดไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY code) และ *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากจังหวัดสระแก้ว (SK code) ออกจาก *S. thailandense* ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี (KB code) ดังนั้น AY และ SK code มีแนวโน้มเป็น new species จากการศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *S. thailandense* (KB code) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้า (*S.*

รหัสชุดโครงการวิจัย 04109263-0013 (รหัส 42 11012 012, 42 11012 013, 42 11012 014, 43 35404 002)
รหัสกิจกรรม 05-02-47-09

carpocapsae) พบว่าสายพันธุ์ไทยมีวงจรชีวิตในตัวแมลง (4 วัน) สั้นกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ (5 วัน) ที่ระดับอุณหภูมิเท่ากัน (26+2 °ซ) และระดับของอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์ โดยพบว่าสายพันธุ์ไทยมีอัตราการขยายพันธุ์ได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-35°ซ ส่วนในสายพันธุ์ต่างประเทศอยู่ระหว่าง 20-30 °ซ จากการทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในการเป็น bio-pesticide เพื่อการคัดเลือกไปใช้ประโยชน์ โดยใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ทางชีววิธีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้า ผลการทดสอบด้วยวิธี quadrant plate พบว่าสายพันธุ์ไทยมีผลรวมค่าระยะทางเฉลี่ย (mean distance, $\overline{\chi}$) ในการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ ($\overline{\chi}$ = 1.20) ใกล้เคียงสายพันธุ์ต่างประเทศ ($\overline{\chi}$ = 1.06) ภายในเวลา 30 นาทีเท่ากัน และจากการทดสอบด้วยเทคนิค migration in sand column พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีการเคลื่อนที่ในดินทรายตามแนวดิ่ง ระยะทาง 5 ซม. เข้าทำลายและฆ่าหนอนเหยื่อล่อได้ 100 % ในเวลา 5 วันเท่ากัน นอกจากนั้น การทดสอบความทนทานของไส้เดือนฝอยต่ออุณหภูมิสูง (heat tolerance) และแสงแดดในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าสายพันธุ์ไทยสามารถฆ่าหนอนตายได้ 100 % เมื่ออยู่ในสภาพอุณหภูมิสูงที่สุด 35 °ซ และยังคงฆ่าหนอนตายได้ 43% เมื่ออยู่ในสภาพอุณหภูมิสูงถึง 40 °ซ แตกต่างกับสายพันธุ์ต่างประเทศซึ่งพบว่าไม่ทนทานต่ออุณหภูมิสูง ตั้งแต่ระดับ 33°ซ ขึ้นไป ไม่สามารถฆ่าหนอนได้ แต่ยังคงศักยภาพในการฆ่าหนอนตายได้เมื่ออยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำสุด 15°ซ เมื่อทำการทดสอบความทนทานต่อแสงแดดในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความทนทานต่อแสงแดดใกล้เคียงกัน และมีศักยภาพในการฆ่าแมลงตาย 83-100 % เมื่อไส้เดือนฝอยถูกแสงแดดในช่วงเช้า (6.00-10.00 น.) และมีศักยภาพในการฆ่าลดลง (43-50 %) เมื่อถูกแสงแดดช่วงเย็น (16.00-18.00 น.) เมื่อนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยไปเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมสูตรดัดแปลงชนิดแข็งกึ่งเหลว 14 สูตร พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดีในอาหารดัดแปลงราคาถูก 3 สูตร คือ DFSM SBSM และ KDSM ให้ผลผลิตเท่ากับ 476 488 และ 636 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ต้นทุนอาหารเท่ากับ 21 26 และ 60 บาท ตามลำดับ ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมสามารถฆ่าหนอนทดสอบตายได้ 80-86% เทียบได้กับไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากแมลงอาศัย ซึ่งฆ่าหนอนทดสอบตายได้ 89% ในเวลาเท่ากัน และจากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้รับพบว่า ปัจจัยต่างๆ มีอิทธิพลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารแข็งกึ่งเหลวสูตร DFSM SBSM และ KDSM โดย pH ของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเท่ากับ 6-7 และการตั้งวางเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ให้ผลผลิตสูงที่สุดของอาหารทั้ง 3 สูตร และการวางภาชนะเพาะเลี้ยงในที่มืดทำให้ผลผลิตสูงกว่าการวางในที่มีแสงหรือมีแสงสลับ (กลางวัน-กลางคืน) ผลของงานวิจัยแสดงถึงศักยภาพของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยที่สามารถพัฒนาและขยายผลไปสู่ภาคการเกษตร เพื่อให้เป็นสารชีวภัณฑ์อีกหนึ่งทางเลือกของเกษตรกรในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี

คำนำ

ปัจจุบันกระแสการตื่นตัวของผู้บริโภคพืชผักปลอดภัยจากสารพิษมีมากขึ้นเรื่อยๆ รวมทั้งนโยบายของรัฐบาลที่ให้ความสำคัญในเรื่องของความปลอดภัยด้านอาหาร (Food Safety) ตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตจากไร่นาจนถึงแปรรูปเป็นอาหารสู่ผู้บริโภค โดยรัฐฯ เร่งผลักดันให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้องทำการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำไปสู่การเกษตรที่ให้ผลิตผลปลอดภัยและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ สารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชจึงเป็นงานวิจัยที่ได้วิจัยและพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพ นำมาทดแทนหรือลดการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงในระดับที่ปลอดภัย โดยเฉพาะในกลุ่มผลิตผักปลอดสารพิษ-ผักอนามัย และผลไม้ปลอดสารพิษเพื่อการส่งออก บางครั้งก็ไม่อาจควบคุมได้ด้วยสารธรรมชาติหรือวิธีเขตกรรม ถ้าพื้นที่นั้นมีการระบาดของแมลงรุนแรง รวมทั้งพวกกลุ่มเกษตรกรที่ประสบปัญหาแมลงดื้อสารเคมี ปัญหาต่างๆ เหล่านี้ทำให้ผลผลิตเสียหายหรือต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ดังนั้น เกษตรกรจึงให้ความสนใจการกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยใช้สารชีวินทรีย์ อันได้แก่ การใช้แบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*) ไวรัสเอ็นพีวี (nuclear polyhedrosis virus) และไส้เดือนฝอย (entomopathogenic nematode) โดยไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. เป็นชีวภัณฑ์ที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยที่มีจำหน่ายเป็นการค้าในปัจจุบันมีราคาค่อนข้างสูงหาซื้อยาก ขาดการประชาสัมพันธ์ เกษตรกรไม่มีความรู้เกี่ยวกับการใช้ไส้เดือนฝอยทำให้การใช้ไม่แพร่หลายเท่าที่ควร ซึ่งเป็นผลมาจากมีการผลิตเป็นการค้าน้อยราย วิธีการผลิตยุ่งยากหลายขั้นตอน และใช้วัสดุ-อุปกรณ์ราคาสูง ความรู้ทางด้านการผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม ยังอยู่ในวงจำกัดและขาดแคลนบุคลากรในสาขานี้ ทำให้งานวิจัยหรือการเผยแพร่ไม่เกิดการแข่งขันในเชิงวิชาการ ส่งผลถึงผลิตภัณฑ์มีจำหน่ายไม่แพร่หลาย และยังมีความยุ่งยากของการเก็บรักษาและขนส่ง กลไกตลาดยังไม่เข้มแข็ง เกษตรกรหาซื้อผลิตภัณฑ์ยาก จึงทำให้การใช้ไส้เดือนฝอยยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบกับสารชีวภัณฑ์อื่นๆ ที่ประสบผลสำเร็จสูงกว่า เช่น แบคทีเรียบีที นั้นมีหลายหน่วยงานศึกษาวิจัยกันมาก ได้แก่ กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล รวมถึงภาคเอกชน ทำให้มีการเผยแพร่งานวิจัยอย่างต่อเนื่อง เกษตรกรให้ความสนใจและรู้จักบีทีกันอย่างแพร่หลาย นอกจากนั้น มีการนำเข้าผลิตภัณฑ์บีทีของภาคเอกชนหลายบริษัทฯ เกิดการแข่งขันในเชิงธุรกิจสูงและเกษตรกรหาซื้อได้ง่าย

ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลงนี้จัดเป็นศัตรูธรรมชาติที่มีประโยชน์ และได้รับความสนใจในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวางทั่วโลก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงตายภายในเวลารวดเร็ว กำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียม และได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัย ต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990)

ไส้เดือนฝอยจัดอยู่ใน order Rhabditida และพบว่ามีเพียง 2 วงศ์ (family) เท่านั้นที่มีศักยภาพในการทำให้เกิดโรคในแมลงคือ family Steinernematidae และ Heterorhabditidae มีการศึกษาวิจัยเป็นเวลากว่า 75 ปี โดยได้ศึกษาไส้เดือนฝอยทั้งในด้านการจัดจำแนกชนิด พฤติกรรม ความอยู่รอด ศักยภาพในการเป็น biological control agent และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด เพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีในหลายประเทศทั่วโลก (Gaugler and Kaya, 1990)

ไส้เดือนฝอย steinernematid มีการกระจายตัวในภูมิภาคต่างๆ ของโลก จากรายงานการกระจายตัวในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีปยุโรป ได้แก่ 36.8 % ในสาธารณรัฐเชคโกสโลวาเกีย (Mracek, 1980) 25 % ในสวีเดน (Burman *et al.,* 1986) 5.8 % ในฟินแลนด์ (Vanninen *et al.,* 1989) 10.4 % ในสาธารณรัฐไอร์แลนด์ (Griffin *et al.,* 1991) 18.3 % ในนอร์เวย์ (Haukeland, 1993) และ 26.5 % ในสวิสเซอร์แลนด์ (Steiner, 1994) ในทวีปอเมริกามีการศึกษาการกระจายตัวและรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และเปอร์โตริโก และใน 3 ประเทศ ของอเมริกาใต้คือ บราซิล อุรุกวัย และอาร์เจนตินา (Hominick and Briscoe, 1990) นอกจากนั้นยังมีรายงานในประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยมีรายงานใน 6 ประเทศ คือ จีน (Shen, 1992) อินเดีย (Poinar *et al.,* 1992) ศรีลังกา (Amarasinghe *et al.,* 1994) ญี่ปุ่น (Yoshida *et al.,* 1998) เกาหลี (Stock *et al.,* 1997) และโอมาน (Elawad *et al.,* 1997) ในทวีปแอฟริกา Waturu *et al.* (1997) ได้รายงานการสำรวจและค้นพบในประเทศเคนยา ส่วนไส้เดือนฝอย heterorhabditid พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Poinar และตั้งชื่อสกุลเป็น *Heterorhabditis* มีการศึกษากันมากในทวีปยุโรปและอเมริกา จากรายงานการสำรวจของ Griffin *et al.* (1991) พบว่า heterorhabditid มีการกระจายตัวตามชายฝั่งหรือพื้นที่ที่เป็นดินทรายเป็นส่วนใหญ่

Poinar (1986) ได้จัดลำดับชั้นของไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรคในแมลง ดังนี้ :-

Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Rhabditida

Sub-order Rhabditina

Superfamily Rhabditoidea

Family Steinernematidae

Family Heterorhabditidae

การจัดจำแนกชนิดโดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดเป็นงานพื้นฐานที่มีความสำคัญในการแบ่งแยกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย (Siddiqi, 1986) หลักของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงคือ

การวัดขนาดสัดส่วนต่างๆ และพิจารณารูปร่างลักษณะที่สำคัญของตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียใน 1st และ 2nd generation โดยใช้ light microscopoe (LM) และ scanning electron microscope (SEM) ความแตกต่างของขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะของไส้เดือนฝอยสามารถจัดจำแนกชนิดได้ (Nguyen and Smart, 1996) นอกจากนั้น ในปัจจุบันวิทยาการทางด้านอณูชีววิทยา (molecular biology) ได้พัฒนาอย่างรวดเร็วและเข้ามามีบทบาทในการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อมภายนอก จึงนิยมใช้ในการตรวจสอบและแบ่งแยกชนิดและสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายในระบบนิเวศ และการใช้ชิ้นของดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบความเหมือนกันหรือแตกต่างกันของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยให้ความถูกต้องมากที่สุด หากเป็นชนิดเดียวกันจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ตลอดจนการใช้เทคนิค molecular biology ยังเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วมากที่สุด เทคนิคที่นำมาใช้จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย ได้แก่ DNA sequence analysis (Curran *et al.,* 1985), restriction fragment length differences (RFLD) (Curran, 1991), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Reid and Hominick, 1992) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Hashmi *et al.,* 1996) เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกและตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง ได้แก่ เทคนิค PCR-RFLP เนื่องจากให้ผลแม่นยำและได้รับการยอมรับ (Hominick *et al.*, 1997)

Tangchitsomkid (2000) ได้เรียบเรียงชนิดของไส้เดือนฝอยที่ค้นพบทั่วโลก แบ่งแยกได้เป็น family Steinernematidae ประกอบด้วย 2 สกุล (genera) คือ สกุล *Steinernema* spp. และสกุล *Neosteinernema* sp. ในปัจจุบันสกุล *Steinernema* spp. จำแนกออกเป็นชนิด (species) ได้ 25 ชนิด คือ *S. kraussei* (Steiner, 1923) syn. *Aplectana kraussei* Steiner, 1923; *S. glaseri* (Steiner, 1929); *S. feltiae* (Filipjev, 1934); *S. affinie* (Bovien, 1937); *S. carpocapsae* (Weiser, 1955); *S. arenarium* (*anomalae*) (Kozodoi, 1984); *S. intermedium* (Poinar, 1985); *S. rarum* (De Doucet, 1986); *S. kushidai* (Mamiya, 1988); *S. ritteri* (Doucet and Doucet, 1990); *S. scapterisci* (Nguyen and Smart, 1990); *S. caudatum* (Xu *et al.,* 1991); *S. neocurtillae* (Nguyen and Smart, 1992 b); *S. longicaudum* (Shen, 1992); *S. cubanum* (Mracek *et al.,* 1994); *S. puertoricense* (Roman and Figueroa, 1994); *S. riobrave* (Cabanillas *et al.,* 1994); *S. bicornutum* (Tallosi *et al.,* 1995); *S. oregonense* (Liu and Berry, 1996 a); *S. monticolum* (Stock *et al.,* 1997); *S. karii* (Waturu *et al.,* 1997); *S. abbasi* (Elawad *et al.,* 1997); *S. ceratophorum* (Jian *et al.,* 1997); *S. siamkayai* (Stock *et al.,* 1998) และ *S. tami* (Luc *et al.,* 2000) และในสกุล *Neosteinernema* sp. จำแนกได้ 1 ชนิด คือ *N. longicurvicauda* (Nguyen and Smart, 1994)

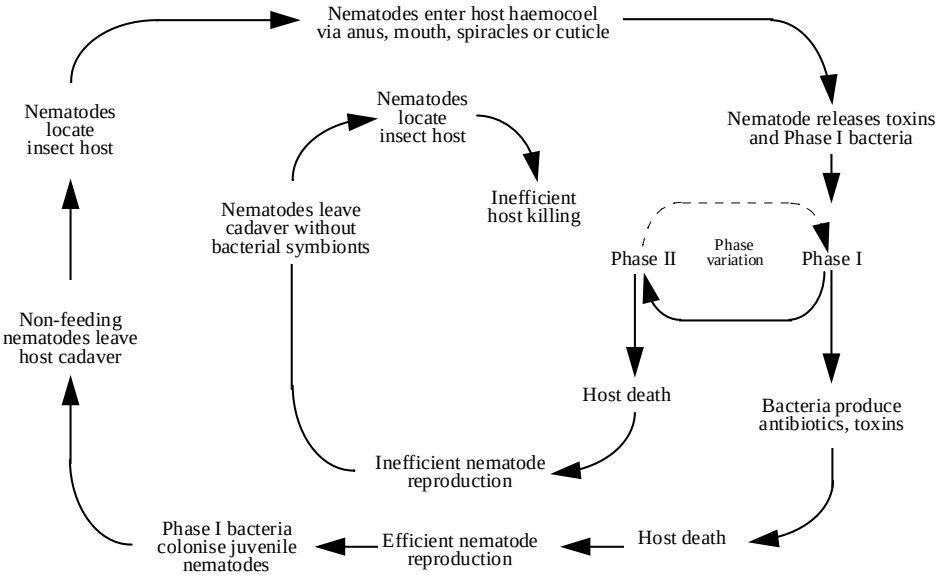
family Heterorhabditidae พบ 1 สกุล คือ *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 8 ชนิด คือ *H. bacteriophora* (Poinar, 1976), *H. zealandica* (Wouts, 1979), *H. megidis* (Poinar *et al.,* 1987), *H. indica* (Poinar *et al.,* 1992), *H. argentinensis* (Stock, 1993), *H. hawaiiensis* (Gardner *et al.,* 1994), *H. brevicaudis* (Liu, 1994) และ *H. marelata* (Liu and Berry, 1996 b)

ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุล คือ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในดิน ดำรงชีวิตเป็นอิสระโดยไม่กินอาหาร เป็นระยะที่เรียกว่า free living หรือตัวอ่อนระยะที่ 3 (third-stage juvenile) หรือตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) เป็นตัวอ่อนระยะเดียวที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีที่สุด โดยลำตัวมีผนังใสที่เรียกว่า cuticle ปกคลุมป้องกันอุณหภูมิและความชื้น มีการสะสมอาหารสำรองพวกไขมัน (lipid reserve) จึงสามารถอยู่ในดินได้นานโดยไม่กินอาหารเพื่อรอคอยแมลงเหยื่อ (Poinar, 1990) เมื่อพบแมลงไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ช่องว่างในตัวแมลง (haemocoel) ได้หลายทาง ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยซึ่งสัมพันธ์กับชนิดแมลงและสภาพแวดล้อม เช่น ไส้เดือนฝอย *S. scapterisci* เข้าทำลายแมลงกะชอนโดยผ่านรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) และเคลื่อนที่เข้าสู่ท่อ trachea ดันตัวจนท่อ trachea ฉีกขาด เพื่อเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวที่มีน้ำเลือด (haemolymph) (Nguyen and Smart, 1991) นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายของ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* สามารถเข้าสู่แมลงได้ทางช่องเปิดตามธรรมชาติอื่นๆ เช่น ปากและช่องขับถ่าย และเจาะทะลุผ่านท่อทางเดินอาหารของแมลง (foregut หรือ midgut หรือ hindgut) เข้าสู่ haemocoel ของแมลง (Poinar, 1979) แต่อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยพวก *Heterorhabditis* มี labial tooth อยู่บริเวณส่วนหัวของไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile มีลักษณะคล้ายฟันที่แข็ง ช่วยในการเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลง ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พบเฉพาะในสกุลนี้เท่านั้น (Wouts, 1979) จากรายงานของ Bedding and Molyneux (1982) แสดงให้เห็นว่า ไส้เดือนฝอย *H. bacteriophora* strain D1 มี tooth ช่วยเจาะเข้าสู่หนอนแมลงวัน (sheep blowfly) ทางผิวหนังบริเวณ intersegment

ในเรื่องของอุณหภูมิมีผลต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยที่แตกต่างกัน โดยพบว่า *S. carpocapsae* มีความสามารถในการเข้าสู่แมลงเหยื่อได้ดีที่อุณหภูมิ 24°ซ และ *S. scapterisci* ดีที่อุณหภูมิ 32°ซ (Grewal *et al.*, 1993)

เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง จะปลดปล่อย symbiotic bacteria สู่น้ำเลือดของแมลง แบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วและสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดอาการของโรคเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. (Poinar and Thomas, 1966) ในปี 1982 Burman ได้รายงานการสร้างสารพิษจากไส้เดือนฝอย *Neoaplectana* (*Steinernema*) *carpocapsae* ที่เรียกว่า NGE (nematode growth extract) ที่ผลิตจากการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในสภาพ axenic culture สารพิษที่ได้เมื่อนำไป inject กับแมลงทดสอบ พบว่าแมลงเกิดอาการ heart beat อ่อนแอและตายภายในเวลา 24 ชม.

โดยสรุปการเกิดโรคในแมลงของไส้เดือนฝอยร่วมกับ symbiotic bacteria แสดงได้ดังไดอะแกรมต่อไปนี้ :-



Connor Thomas (http:/www.microbiology.adelaide.edu.au/)

ไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode มีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ 4 ครั้ง ประกอบด้วยระยะตัวอ่อน (juvenile stage) 4 ระยะคือ ตัวอ่อนระยะที่ 1 (J1) ฟักออกจากไข่ภายในตัวแม่ มีการลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ตัวอ่อนระยะที่ 3 (J3) และตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) ตามลำดับ ก่อนเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ตัวอ่อนทั้ง 4 ระยะ และตัวเต็มวัยจะเจริญเติบโตภายในแมลงอาศัยเท่านั้น มีเพียงระยะเดียวที่อยู่นอกตัวแมลงคือ ตัวอ่อนระยะ infective juvenile (IJ) เท่านั้น ซึ่งก็คือตัวอ่อนในระยะ J2 และ J3 ที่มีการปรับสภาพตัวให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก และเคลื่อนที่ออกจากซากแมลง ดำรงชีพอยู่ในดินโดยไม่กินอาหารได้เป็นเวลานานเพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ (Nguyen and Smart, 1992 a)

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดของการขยายพันธุ์ โดยพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic เท่านั้น คือการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ส่วนไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* พบว่า ใน generation ที่ 1 จะมีการขยายพันธุ์แบบ hermaphroditic โดยตัวเมียสามารถสร้างไข่และสเปิร์มภายในตัวให้ลูกได้เอง และใน generation ที่ 2 เป็นแบบ amphimitic (Poinar, 1990)

ความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ระหว่างไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode ใน family Steinernematidae และ Heterorhabditidae กับแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae เป็นการอยู่ร่วมกันแบบที่เรียกว่า symbiotic association (Poinar and Thomas, 1966) พบอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย โดยแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดในดินหรือในน้ำด้วยตัวมันเองได้ (Poinar, 1979) และไม่ทำให้เกิดโรคเมื่ออยู่ในระบบย่อยอาหารของแมลง (Poinar and Thomas, 1967) จนกว่าไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง จึงสามารถออกมาอยู่ในน้ำเลือดของแมลงได้ ดังนั้น การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียจากซากแมลงหนึ่งสู่แมลงตัวใหม่ต้องอาศัยไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำและปกป้องแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อม

เซลล์ของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในน้ำเลือดของแมลงจึงจะสามารถทวีจำนวนได้ และเซลล์ของแบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารสำคัญต่อกระบวนการขยายพันธุ์ (reproduction) ของไส้เดือนฝอยภายในตัวแมลง (Akhurst and Boemare, 1990)

แบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยจัดอยู่ในสกุล *Xenorhabdus* spp. มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) เป็นพวก facultative anaerobic แกรมลบ จากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Volume 1) มีการจัดจำแนกโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีไว้ 2 ชนิด (species) ได้แก่ *X. luminescens* และ *X. nematophilus* (Krieg and Holt, 1984)

Akhurst (1980) พบว่า *Xenorhabdus* spp. มี 2 รูปแบบ (form) คือ primary form และ secondary form การแยกความแตกต่างระหว่าง form ของ *X. nematophilus* อาศัยลักษณะโคโลนี (colony) ในปี ค.ศ. 1988 Boemare and Akhurst ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของ *Xenorhabdus* spp. ทั้ง 2 form ที่แยกจาก Steinernematidae และ Heterorhabditidae 21 สายพันธุ์ (strain) พบว่า *Xenorhabdus* ของทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

ในการแยกความแตกต่างของทั้ง 2 form ทำได้โดยดูความสามารถของโคโลนีในการดูดสี neutral red จากอาหาร MacConkey agar และการดูดสี bromthymol blue จากอาหาร NBTA นอกจากนั้น ยังแยกความแตกต่างด้วยการทดสอบ antibiotic activity และ lecithinase (Akhurst, 1980)

Akhurst and Boemare (1988) ได้ทำการศึกษาการจัดหมวดหมู่ *Xenorhabdus* จากเชื้อ ทั้ง 2 form จำนวน 21 สายพันธุ์ โดยทำการทดสอบคุณสมบัติ 240 ลักษณะ และได้เสนอจัดแบคทีเรีย *X. nematophilus* เป็น 4 species คือ *X. nematophilus*, *X. beddingii, X. bovienii* และ *X. poinarii* ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 (Boemare *et al.,* 1993) ได้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี DNA hybridization และเปลี่ยนจาก *X. luminescens* เป็นสกุลใหม่คือ *Photorhabdus* โดยใช้ความแตกต่างของยีนหรือดีเอ็นเอเป็นตัวแบ่งแยก

Xenorhabdus spp. ที่แยกจากธรรมชาติมีลักษณะเป็น primary form โดยมีลักษณะโคโลนีนูนโค้งทึบแสง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสี (dye) เชื้อสามารถดูดซับสีทำให้โคโลนีมีสี แต่ถ้าเลี้ยง *Xenorhabdus* spp. ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน เชื้อเปลี่ยนเป็น secondary form โคโลนีมีลักษณะแบนและเชื้อไม่สามารถดูดซับสีที่ผสมลงในอาหารได้ ไม่พบความแตกต่างในการทำให้เกิดโรคของเชื้อทั้ง 2 form แต่พบว่ามีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับไส้เดือนฝอย โดยไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย primary form ได้ดีกว่า secondary form ไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่แบคทีเรียชนิดหนึ่งๆ มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยได้หลายชนิด แบคทีเรียแต่ละชนิดยังสามารถจัดแบ่งได้อีกหลายกลุ่ม นอกจากการจัดจำแนกแบคทีเรีย (classical taxonomy) โดยใช้วิธีการที่ถือปฏิบัติกันมา ได้มีการนำวิธีการอื่นๆ มาช่วยในการจัดจำแนก เช่น การศึกษาดีเอ็นเอ วิธีการทางเซรุ่มวิทยา การใช้ gas-liquid chromatography ของ fatty acid methyl esters (FAMEs) (Aguillera *et al.,* 1993) เป็นต้น การจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. มีความสำคัญมาก เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความผันแปรสูงอีกทั้งยังเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย ประกอบกับมีความซับซ้อนของความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 ชนิด คือ แมลง ไส้เดือนฝอย และแบคทีเรีย

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่ *S. carpocapsae* มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียชนิด *X. nematophilus* ไส้เดือนฝอย *S. feltiae, S. affinis, S. kraussei, S. intermedia* มีความสัมพันธ์กับ *X. bovienii* เป็นต้น ความเฉพาะเจาะจงของการอยู่ร่วมกันของไส้เดือนฝอยและ แบคทีเรียขึ้นกับสารอาหารที่จำเป็นสำหรับไส้เดือนฝอยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและการเก็บรักษาเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณลำไส้ของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (Akhurst and Boemare, 1990)

ความต้องการสารอาหารของไส้เดือนฝอยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นนี้พบว่า ไม่เฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรียมากนัก โดยไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่มี *X. nematophilus* อยู่ร่วม ยังสามารถขยายพันธุ์ในอาหารที่มีแบคทีเรียชนิดอื่นได้ แต่การขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยจะลดลง อย่างไรก็ตาม *Steinernema* spp. ไม่สามารถขยายพันธุ์ในอาหารที่มี *X. luminescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยสกุล *Heterorhabditis* spp. (Akhurst and Boemare, 1990)

แมลงที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยพบว่า ไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆ เข้าทำลายซ้ำเติม เป็นผลมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเลือดของแมลง สร้างสาร antimicrobial ซึ่งจะไปยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียอื่นๆ Paul *et al.* (1981) พบว่า antimicrobials เป็นสารประกอบทางเคมี (chemical compound) ใน *X. nematophilus* strain R เป็น 4 indole derivatives และ *X. luminescens* strain Hb เป็น 2 *trans-stilbene* derivatives

ความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงของ *Xenorhabdus* spp. มีประสิทธิภาพสูงมาก เมื่ออยู่ในน้ำเลือดภายในช่องว่างลำตัวแมลง โดยพบว่า หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) มีจำนวนของเซลล์แบคทีเรียเพียง 50 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดโรคในหนอนชนิดนี้ได้ (Akhurst, 1982)

ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย นำมาผลิตเป็นการค้า ได้แก่ 6 ชนิด ในสกุล *Steinernema* spp. คือ *S. carpocapsae, S. glaseri, S. feltiae, S. riobrave, S. scapterisci* และ *S. kushidai* และ 2 ชนิด ในสกุล *Heterorhabditis* spp. คือ *H. bacteriophora* และ *H. megidis* (Ehlers, 1995)

การนำไส้เดือนฝอยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช มีการศึกษาวิจัยถึงวิธีการใช้ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากไส้เดือนฝอยเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไม่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง แสงอุลตราไวโอเลต สภาพความแห้ง ซึ่งมีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยต่ำลง ดังนั้น วิธีการใช้จึงมีปัจจัยหลายประการเป็นตัวกำหนด ปัจจัยที่สำคัญคือ ปัจจัยทางด้านพฤติกรรมของไส้เดือนฝอยเป็นแบบ cruiser หรือ ambusher โดยพฤติกรรมแบบ cruiser เป็นไส้เดือนฝอยพวกที่มีการเคลื่อนที่เข้าหาแมลงเหยื่อ ได้แก่ *S. glaseri* และ *H. bacteriophora* ส่วนพฤติกรรมแบบ ambusher เป็นพวกไม่ค่อยเคลื่อนที่ แต่จะหยุดอยู่กับที่ (sit and wait) และมีการยืดลำตัวขึ้นโบกส่วนหัวหรือลำตัวไปมา (nictating) เพื่อรอจังหวะในการกระโดดเข้าเกาะตัวแมลงที่วิ่งไปมา จะพบไส้เดือนฝอยพวกนี้อยู่บริเวณผิวดิน ได้แก่ *S. carpocapsae* และ *S. scapterisci* (Campbell and Gaugler, 1993) ลักษณะพฤติกรรมที่แตกต่างทำให้ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงแตกต่างกัน เช่น การควบคุมแมลงกระชอนในสนามกอล์ฟ ควรเลือกใช้ *S. scapterisci* เนื่องจากแมลงกระชอนเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วบนผิวดิน และใช้

S. glaseri ควบคุม white grub ที่กัดกินรากพืชใต้ดิน (Klein, 1990) นอกจากนั้น ปัจจัยทางด้านความแข็งแรงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตเป็นการค้ามีความอยู่รอดและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งขึ้นกับรูปแบบการผลิต การเก็บรักษาและการขนส่ง ที่มีผลต่อการตายของไส้เดือนฝอย จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียและปริมาณไขมันสะสมในตัวไส้เดือนฝอย ตลอดจนปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ โครงสร้างดิน อุณหภูมิดิน และความชื้นในดิน (Kaya, 1990) การนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ประสบผลสำเร็จนั้น จึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ความรู้ทางวิชาการจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพิจารณาเลือกใช้ไส้เดือนฝอยชนิดใดไปควบคุมแมลงศัตรูพืชให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีศักยภาพในการเป็น bio-pesticide ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1931 โดย Glaser ได้เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* และ *S. carpocapsae* เป็นผลสำเร็จในอาหารชนิดวุ้นที่ประกอบด้วย 1% ไตกระต่าย และ 1% วุ้น เป็นอาหารที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนหรือที่เรียกว่า axenic culture ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 Stoll พัฒนาการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตับเป็นองค์ประกอบ โดยเลี้ยงในหลอดทดสอบที่มีการเขย่า 100 ครั้งต่อนาที สามารถเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวได้ แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงยังเป็นงานวิจัยในห้องทดลอง ผลผลิตที่ได้ต่ำต้นทุนสูง จึงได้มีการค้นคว้าและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านเทคนิคและสูตรอาหารเพื่อให้ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดและต้นทุนการผลิตต่ำ (Friedman, 1990)

Dutky *et al.* (1964) พบว่า การนำ symbiotic bacteria ที่แยกได้จากตัวของไส้เดือนฝอยใส่เพิ่มลงในอาหารเทียมที่ใช้เพาะเลี้ยงหรือที่เรียกว่า monoxenic culture ทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงขึ้น โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อกระบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

Bedding (1981) ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบของ 70% ไตหมู 10% ไขมันสัตว์ และ 20% น้ำ ของการเลี้ยง *Steinernema* sp. และ 60% ไตหมู 20% ไขมันสัตว์ และ 20%น้ำ ของการเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงเฉลี่ย 40 ล้านตัวต่อ flask ขนาด 500 มล. ต่ออาหาร 70 กรัม ต้นทุนการผลิตเท่ากับ $ 0.50/flask (ประมาณ 20 บาท) เทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ต่อมา Bedding (1984) ได้ศึกษาเทคนิคการผลิตเพื่อขยายปริมาณในระดับการค้า โดยเพาะเลี้ยงในถุง polypropylene ขนาด 1.0x0.5 เมตร ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงถึง 2,000 ล้านตัวต่อถุง

มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบของอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใน 2 สกุล ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ซึ่งมีความแตกต่างกันของสารอาหารที่ไส้เดือนฝอยต้องการ จากรายงานของ Dunphy and Webster (1989) ได้ศึกษาแหล่งอาหารต่างๆ เพื่อการขยายปริมาณ *S. carpocapsae* DD 136 strain และ *H. heliothidis* พบว่าสารอาหารชนิดต่างๆ มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย culture ที่มี stearic acid จากน้ำมันดอกทานตะวัน (0.1% V/V) เพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และน้ำมันตับปลา (0.5% V/V) เพิ่มผลผลิต *H. heliothidis*

ในปัจจุบันการผลิตไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode สามารถผลิตในอาหารเหลวได้สูงถึง 190,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระดับ shake flask และ 90,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในถังหมัก (fermenter) (Friedman, 1990) มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศ เช่น บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *H. megidis* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys H บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ, 2541ก)

รูปแบบผลิตภัณฑ์ (formulation) ไส้เดือนฝอย และการนำไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ มีหลายรูปแบบ ได้แก่ การผสมไส้เดือนฝอยในดินเหนียว ฟองน้ำ เวอร์มิคูไลท์ บรรจุเป็นแคปซูลในสารเอลจิเนท (alginate capsule) และในรูปเจลโพลีอะคลีลาไมด์ (gel-forming polyacrylamides) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยมีจำหน่ายในหลายประเทศ เช่น บริษัท Mellinger's ในสหรัฐอเมริกา ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในชื่อผลิตภัณฑ์ scanmark ราคา $ 13.95 บรรจุไส้เดือนฝอย 7 ล้านตัว สามารถสั่งซื้อได้ง่ายโดยผ่านทาง internet และชำระเงินด้วยบัตรเครดิต

วิธีการนำไปใช้ง่ายและสะดวก โดยละลาย formulated product ในน้ำตามคำแนะนำของแต่ละผลิตภัณฑ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนไส้เดือนฝอยและชนิดของแมลงเป้าหมาย ด้วยวิธีฉีดพ่นด้วยเครื่องพ่นสารชนิด สะพายหลัง หรือใช้วิธีการหว่านในแปลงปลูกที่มีแมลงศัตรูระบาด ควรใช้ในช่วงเช้าหรือเย็น เพื่อหลีกเลี่ยงแสงอุลตราไวโอเลตและความร้อนจากแสงแดดในเวลากลางวัน

สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเริ่มมีการศึกษาค้นคว้าเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้นำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* All strain เป็นสายพันธุ์จากอเมริกาที่ผลิตเป็นการค้าทั่วโลก นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมและนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญหลายชนิดประสบผลสำเร็จในสภาพไร่กับหนอนเจาะเปลือกลองกอง หนอนกระทู้หอมทำลายดอกดาวเรือง และด้วงหมัดผักทำลายผักกาดหัว เป็นต้น ในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจการนำจุลินทรีย์ไปใช้ควบคุมแมลง โดยเฉพาะแมลงดื้อสารเคมี และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งซึ่งประสบผลสำเร็จในการผลิตเป็นการค้าและเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในประเทศไทย (วัชรี, 2542)

นอกจากนั้น ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการเป็น biological control agent และได้รับความสนใจทั้งจากภาครัฐและภาคเอกชน มีการศึกษาวิจัยนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรที่ประสบผลสำเร็จและนำไปใช้ประโยชน์ในประเทศไทยคือ การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) กำจัดหนอนผีเสื้อที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชหลายชนิด (อัจฉรา, 2542) การใช้ไวรัส nuclear polyhedrosis virus (NPV) ควบคุมหนอนกระทู้หอมในแปลงผัก (อุทัย, 2542) การใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (พากเพียรและคณะ, 2543) การใช้รา *Trichoderma harzianum* ควบคุมรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่า

โคนเน่าของพริกไทยและทุเรียน เป็นต้น ทำให้จุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้ได้รับความสนใจและยอมรับจากเกษตรกรในการนำไปใช้ทดแทนสารเคมีบางส่วน โดยเฉพาะเลือกใช้กับแมลงศัตรูพืชที่ดื้อสารเคมี เช่น หนอนหนังเหนียว (*Spodoptera exigua*) ที่ทำความเสียหายกับพืชผักและไม้ดอกหลายชนิด

การค้นหาจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำจุลินทรีย์มาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีข้อจำกัดในการนำไปใช้แตกต่างกันไป เช่น ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินร่วนปนทราย ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Kaya, 1977) เป็นต้น ข้อจำกัดดังกล่าวจึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยข้อมูลพื้นฐานทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรมการดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลทางวิชาการเหล่านี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาจุลินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง การพยายามค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสงอุลตราไวโอเลต แมลงอาศัย ชนิดและคุณสมบัติของดิน เพื่อนำจุลินทรีย์สายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ในfamily Steinernematidae จำนวน 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KB) พิจิตร (PC) อยุธยา (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) และสระแก้ว (SK) และfamily Heterorhabditidae จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (RE) นำมาเก็บรวบรวมเป็น culture collection ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ, 2543)

Tangchitsomkid (2000) ได้ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) และใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในเขตจังหวัดกาญจนบุรี (*Steinernema* sp. KB code) พบว่า เป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่และเป็นสายพันธุ์ไทย ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์คือ *S. thailandense* n. sp.[1/] (นุชนารถ, 2541ข; Tangchitsomkid *et al.*, 2001)

จากการศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. และความสามารถในการเป็น biological control agent ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า มีวงจรชีวิต 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ระดับของอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย และความสามารถในการเข้าทำลายแมลงทดสอบ โดยพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 25 ถึง 35 °ซ เป็นช่วงที่ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตได้ดี มีอัตราส่วนของเพศผู้ : เพศเมีย เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณรุ่นลูกได้สูง และไส้เดือนฝอยมีศักยภาพในการฆ่าแมลงตายได้เร็วที่สุด (ไม่เกิน 12-18 ชม.) ที่ช่วงอุณหภูมิดังกล่าว การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนอนกินรังผึ้ง

[1/]**หมายเหตุ :** ให้ชื่อวิทยาศาสตร์ในเบื้องต้นเป็น *Steinernema thailandense* ใช้ชื่อนี้เฉพาะในประเทศไทย

พบว่า ไส้เดือนฝอยอัตรา 10 ตัวต่อแมลง 1 ตัว สามารถทำให้หนอนกินรังผึ้งตาย 53 % ในเวลา 24 ชม. และจัดเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ทนร้อนที่มีศักยภาพในการฆ่าหนอนกินรังผึ้งตาย 100 % ในเวลา 22 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ และคงศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงได้สูงที่อุณหภูมิ 38 °ซ เมื่อนำไส้เดือนฝอยมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดวุ้น พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 6.4×10^5 ต่ออาหาร 20 กรัม ในเวลา 10 วัน การศึกษาศักยภาพในการกำจัดแมลงสำคัญ 12 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera litura*) หนอนกระทู้ผัก (*S. exigua*) หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) หนอนเจาะดอกมะลิ (*Henedecasis duplifacialia*) หนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) หนอนในถุงเห็ด (unidentified) ตัวเต็มวัยของด้วงหมัดกระโดด (*Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วงกินรากสตรอเบอรี่ (unidentified) เพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) และปลวก (*Coptotermes* sp.) พบว่า *S. thailandense* n. sp. มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 56 60 89 92 100 100 100 33 20 44 และ 42 % ในเวลา 24 ชม. ตามลำดับ และในแมลงสาบ (*Periplaneta americana*) เท่ากับ 57 % ในเวลา 48 ชม. (Tangchitsomkid, 2000)

จากผลการศึกษาวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย มีคุณสมบัติในการเป็น bio-pesticide ที่ดี และจัดเป็นสายพันธุ์ทนร้อน (heat tolerance) เช่นเดียวกับ *S. riobrave* จากรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา และ *S. abbasi* จากประเทศโอมาน มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เหมาะที่จะนำมาพัฒนาใช้ในประเทศไทยอีกชนิดหนึ่งเพื่อเป็นทางเลือกในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่มีความหลากหลาย การพัฒนาโดยนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ปฏิบัติ สอดคล้องกับภาระกิจของกรมวิชาการเกษตร และสนองนโยบายของแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 9 ในเรื่องของการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพในการพัฒนาพืชอย่างยั่งยืน ตลอดจนการพัฒนาอารักขาพืชโดยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่เหมาะสม งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema* spp. สายพันธุ์ไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นโครงการวิจัยครบวงจร (package) และมีความเชื่อมโยงอย่างเป็นระบบ มีความสัมพันธ์และสนับสนุนกันโดยการดำเนินงานวิจัยอย่างเป็นขั้นตอน มีเป้าหมายหลักคือ การพัฒนาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยให้นำไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ขั้นตอนของงานวิจัยเริ่มจากการจัดเก็บไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย รวบรวมเป็น culture collection นำมาจัดจำแนกชนิดโดยวิธีผสมข้าม (cross mating) และตรวจสอบสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ให้ความถูกต้องและแม่นยำ จากนั้นนำไส้เดือนฝอยมาทำการคัดเลือกโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ผลิตเป็นการค้าด้วยเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธี ตลอดจนศึกษาพฤติกรรม ชีววิทยา และนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์จากแหล่งอื่น รวมทั้งแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria ที่อยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย เก็บรวบรวมเป็น stock culture เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมชนิดต่างๆ สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ทำการพัฒนาสูตรอาหาร เทคนิคการเพาะเลี้ยง และศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขยายปริมาณของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

ผลงานวิจัยที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ เพื่อนำไปพัฒนาในกระบวนการเพาะเลี้ยงให้ได้เทคโนโลยีการผลิตที่มีต้นทุนต่ำและได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูง เทคโนโลยีการผลิตดังกล่าวจะสามารถถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนนำไปขยายผลในเชิงพาณิชย์ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีรูปแบบการนำไปใช้ได้ง่าย สะดวก และมีประสิทธิภาพ ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยที่ผลิตจากอาหารเทียมภายใต้เทคโนโลยีจะได้มีการนำไปทดสอบใช้ควบคุมแมลงศัตรูสำคัญ ให้ได้ข้อมูลคำแนะนำและเผยแพร่ เป็นเอกสาร-คำแนะนำแก่เกษตรกร ในการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างถูกต้อง ประหยัดและปลอดภัย ซึ่งจะเกิดประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรมต่องานวิชาการด้านไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงและเกษตรกรของประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย Thai isolate ให้คงความมีชีวิตและศักยภาพที่อุณหภูมิเหมาะสม และเก็บรวบรวมสายพันธุ์ไทยในแต่ละพื้นที่แบ่งแยกเป็นไอโซเลท (isolate) พร้อมกำหนดรหัสไส้เดือนฝอย (nema code) เพื่อการอนุรักษ์ความหลากหลายของสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงที่พบในเขตร้อนชื้น

2. เพื่อการจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากประเทศไทย โดยศึกษาการผสมข้าม (cross mating) และการตรวจสอบสายพันธุ์ (strain) ในระดับยีนด้วยเทคนิค PCR-RFLP

3. เพื่อศึกษาชีววิทยาและคัดเลือกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยสู่กระบวนการผลิต โดยศึกษาวงจรชีวิตและการเจริญเติบโตในแมลงอาศัย ศึกษาผลของอุณหภูมิระดับต่างๆ ต่อวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในแมลงอาศัยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์การค้า การคัดเลือกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธี ได้แก่ quadrant plate, migration in sand column, heat tolerance และ exposure to sunlight เปรียบเทียบกับสายพันธุ์การค้า

4. เพื่อการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ monoxenic culture โดยพัฒนาสูตรอาหารที่มีราคาถูก และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการขยายพันธุ์และเพิ่มปริมาณของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว ได้แก่ การศึกษาระดับ pH ของอาหาร ระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสม และการมีหรือไม่มีแสง ในขณะเพาะเลี้ยง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย *Steinernema thailandense* n. sp. และ *Steinernema* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่แยกจากจังหวัดพิจิตร (PC) พระนครศรีอยุธยา (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) สระแก้ว (SK) นครพนม (NN) อุบลราชธานี (UBs) และร้อยเอ็ด (REs)

2. ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะเข้าทำลายสายพันธุ์ต่างประเทศ ได้แก่ *S. carpocapsae* All strain, และ *S. feltiae* (ได้รับมาจาก Dr. Mutsuhiro Yoshida, NIAES, Japan)

3. หนอนกินรังผึ้ง (wax moth, *Galleria mellonella* L.)

4. สารอาหารเลี้ยงแมลง ได้แก่ แป้งข้าวจ้าว นมถั่วเหลือง น้ำผึ้ง ฟอร์มาลีน กลีเซอรีน ไขผึ้ง และวิตามิน เป็นต้น

5. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (LM) พร้อมกล้องถ่ายภาพ

6. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler)

7. ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอแยกด้วยกระแสไฟฟ้า

8. เครื่องมือตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (UV transilluminator) และกล้องบันทึกภาพโพลาลอยด์

9. เครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง ตู้ deep freez เครื่องชั่ง เครื่องวัด pH เครื่องทำน้ำกลั่น เครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบ/นาที และตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นต้น

10. สารเคมีสำหรับแยกสกัดดีเอ็นเอ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ได้แก่ worm lysis buffer, 18S และ 26S primer, 10x PCR buffer, dNTP, Taq polymerase, agarose, Tris-borate buffer, ethidium bromide และ restriction enzyme 9 ชนิด เป็นต้น

11. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน และตู้อบฆ่าเชื้อ เป็นต้น

12. สารอาหารเลี้ยงไส้เดือนฝอยในสภาพ monoxenic culture ได้แก่ นมถั่วเหลือง นมผง อาหารสุนัขสำเร็จรูป น้ำมันหมู ไตหมู ไส้ไก่ หัวใจไก่ และแป้งถั่วเหลือง เป็นต้น

13. สารเคมีสำหรับแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria ได้แก่ nutrient agar, nutrient broth, bromthymol blue, 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride เป็นต้น

14. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ เครื่องแก้ว กระบอกพลาสติก กรวยแก้ว ขวดพลาสติกชนิด culture flask จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 9 ซม. และกระดาษกรอง (Whatman #2) เป็นต้น

วิธีการ

1. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate

1.1 การเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยเพื่ออนุรักษ์และนำไปใช้ประโยชน์

ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในประเทศไทยคือ *Steinernema thailandense* n. sp. จำนวน 1 ชนิด แยกจากจังหวัดกาญจนบุรี และ *Steinernema* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่แยกจากจังหวัดพิจิตร อยุธยา กาฬสินธุ์ มหาสารคาม ขอนแก่น หนองคาย สระแก้ว นครพนม อุบลราชธานี และร้อยเอ็ด รวมทั้งหมด 11 พื้นที่ แต่ละชนิดและไอโซเลทจัดเก็บในน้ำกลั่นในขวดพลาสติกชนิด culture flask รวบรวมเฉพาะไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile (IJ) เท่านั้น โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณจากหนอนกินรังผึ้ง (wax moth, *Galleria mellonella* L.) ที่เพาะเลี้ยงจากอาหารเทียม และวิธีการจัดเก็บไส้เดือนฝอย ดังนี้ :-

1.1.1 การเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้งในอาหารเทียม หนอนกินรังผึ้งใช้เป็นหนอนทดสอบและเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย Thai isolate เพื่อการเก็บรักษา โดยหนอนกินรังผึ้งเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเทียมสูตรดัดแปลง ส่วนประกอบ คือ แป้งข้าวจ้าว 100 กรัม นมถั่วเหลือง 200 กรัม น้ำผึ้ง 100 มล. ฟอร์มาลีน 5 มล. วิตามิน 20 มล. กลีเซอรีน 100 มล. ไขผึ้ง 100 กรัม และน้ำกลั่น 375 มล. นำไข่ของหนอนกินรังผึ้งประมาณ 200-300 ฟอง ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 32.5 x 17.6 x 10 ซม. มีฝาครอบเป็นลวดตาข่ายให้อากาศถ่ายเท ที่บรรจุอาหารเทียม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25-28 °ซ ไข่ฟักเป็นตัวหนอนวัย 1 ในเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นหนอนเจริญเติบโตตามลำดับ ในเวลาประมาณ 3 สัปดาห์ ได้หนอนวัยสุดท้ายก่อนเข้าดักแด้ (late instar larvae) น้ำหนักประมาณ 2.0-2.5 กรัม ซึ่งเป็นวัยที่ใช้ในการขยายปริมาณไส้เดือนฝอย เพื่อการจัดเก็บในแต่ละไอโซเลท

1.1.2 เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินรังผึ้ง โดยนำหนอนจำนวน 25 ตัว วางในจานเลี้ยงเชื้อ (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.) ที่มีกระดาษกรอง (Whatman # 2) วางไว้ ใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 5,000 + 500 ตัวที่อยู่ในน้ำกลั่น 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 25+2 °ซ เป็นเวลา 2 วัน นำหนอนมาล้างผ่าน alcohol 75 % และ น้ำกลั่น 3 ครั้ง นำมาวางบน White trap เป็นเวลา 7 วัน ไส้เดือนฝอย IJ รุ่นใหม่ เคลื่อนที่ออกจากซากหนอน จากนั้นนำ IJ ที่ได้มาล้างด้วย hyamine 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว ล้างน้ำกลั่น 3 ครั้ง และเก็บในขวดชนิด culture flask ขนาด 250 มล. จำนวน 50,000+5,000 ตัว ในน้ำกลั่น 25 มล. บันทึกรหัสไส้เดือนฝอยและวันที่/เดือน/ปี ที่จัดเก็บ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25+2 °ซ ไส้เดือนฝอยแต่ละรหัส ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 3 เดือน กับหนอนกินรังผึ้งตามวิธีการเดิม

1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

วางแผนการทดลองแบบ Completely Random Design (CRD) 4 กรรมวิธี คือ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 15 25 และ 33 °ซ จำนวน 3 ซ้ำ

ไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของ *S. thailandense* n. sp. เตรียมได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอย เป็นเวลา 10 วัน ได้ IJ รุ่นใหม่เพื่อใช้ในการทดลอง นำมาผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย hyamine 0.1 % และล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ไส้เดือนฝอยที่ได้นำใส่ลงในขวดชนิด culture flask ขนาด 250 มล. จำนวน 50,000+5,000 ตัว ในน้ำกลั่น 25 มล. จำนวน 12 ขวด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 15 25 และ 33 °ซ อย่างละ 3 ขวด (ซ้ำ)

ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยทุก 15 30 45 60 75 และ 90 วัน โดยสุ่มนับครั้งละ 1 มล. ต่อขวด รวม 3 ขวด (ซ้ำ) ในแต่ละอุณหภูมิ นำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ANOVA) ตามแผนการทดลอง CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test (DMRT)

2. การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp.

2.1 การจัดจำแนกโดยวิธีผสมข้ามชนิด (cross mating)

เตรียมน้ำเลือด (haemolymph) จากหนอนกินรังผึ้ง โดยนำตัวหนอนวัยสุดท้ายก่อนเข้าดักแด้ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 75 % ล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดขาคู่ที่สองของหนอนและบีบน้ำเลือดเก็บไว้ในหลอดทดสอบขนาด 1.5 มล. เก็บน้ำเลือดไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ก่อนใช้ในการทดลอง

ไส้เดือนฝอยที่ใช้ในการทดสอบ cross mating คือ *S. carpocapsae* All strain, *S. feltiae, S. thailandense* n. sp. และ *Steinernema* spp. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย จำนวน 10 ไอโซเลท (PC AY KS MK KK NK SK NN REs และ UBs) นำไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของแต่ละชนิด ใส่ลงไปในหยดน้ำเลือดบนสไลด์หลุม นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำ ปิดฝาจาน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25+2 °ซ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM จนเป็น young male (YM) และ young female (YF) เขี่ยไส้เดือนฝอยผสมสลับระหว่าง YM และ YF จำนวนอย่างละ 10 ตัวของแต่ละชนิดที่ใช้ทดสอบ ลงในหยดน้ำเลือดบนสไลด์หลุม นำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองชุ่มน้ำ โดยมีไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกันผสมกันเองเป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิ 25+2 °ซ เป็นเวลา 10 วัน ตรวจสอบการผสมพันธุ์และให้ลูกในแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM งานทดลองปฏิบัติซ้ำ 3 ครั้ง

2.2 การใช้เทคนิค PCR-RFLP ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. Thai isolate

2.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอย ตัดลำตัวไส้เดือนฝอย Thai isolate (AY, SK, PC code) *S. thailandense* n. sp., *S. carpocapsae* และ *S. feltiae* แต่ละชนิดด้วยเข็มขนาดเล็กในหยดของ worm lysis buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.45 % Tween 20, 0.01 % gelatin, 60 mg/ml proteinase K) บนสไลด์แก้วภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ดูดของเหลวเก็บไว้ในหลอดทดสอบขนาด 0.5 มล. จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -40 °ซ ถึง -80 °ซ เป็นเวลา 10-20 นาที ต่อด้วย 65 °ซ 1 ชั่วโมง และ 95 °ซ 10 นาที

2.2.2 การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (polymarase chain reaction) นำดีเอ็นเอ ที่เตรียมได้มาใช้เป็นต้นแบบสำหรับการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีของ Joyce *et al.* (1994) โดยใช้ไพรเมอร์

18S (TTGATTACGTCCCTGCCCTTT)

26S (TTTCACTCGCCGTTACTAAGG)

ในปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 5 ไมโครลิตร dNTP 0.5 ไมโครลิตร 18S (forward primer) 0.5 ไมโครลิตร 26S (reverse primer) 0.5 ไมโครลิตร Taq polymerase (2U/ml) 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในปฏิกิริยาให้ครบ 45 ไมโครลิตร และใส่ดีเอ็นเอต้นแบบ (worm lysate) 5 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ตั้งโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

1 รอบที่	94°ซ	(2 นาที)
40 รอบที่	94°ซ	(30 วินาที)
	45°ซ	(60 วินาที)
	72°ซ	(1.5 นาที)
1 รอบที่	72°ซ	(5 นาที)

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x Tris-borate buffer (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อมสี gel ด้วย ethidium bromide และตรวจแถบ (band) ของดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (UV transilluminator)

2.2.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism) ตามวิธีการของ Hominick *et al.* (1997) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ของไส้เดือนฝอย AY, SK, PC, *S. thailandense* n. sp., *S. carpocapsae* และ *S. feltiae* ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 9 ชนิด คือ *Alu* I, *Dde* I, *Hha* I, *Hind* III, *Hinf* I, *Hpa* I, *Rsa* I, Sau3A I และ *Xba* I ปริมาตรแต่ละเอนไซม์ เท่ากับ 10 ไมโครลิตร รวมกับดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ของแต่ละไอโซเลท บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาตั้งแต่ 3-12 ชม. จากนั้นนำดีเอ็นเอมาแยกขนาดใน 1.5% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 3 ชม. และย้อมสีด้วย ethidium bromide ตรวจสอบจำนวนและขนาดของดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator และบันทึกภาพด้วยกล้องโพลาลอยด์

3. การศึกษาชีววิทยาและการคัดเลือกไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp.

3.1 การศึกษาวงจรชีวิต

ใช้หลอดทดสอบชนิด microtube (1.5 มล.) ตัดกระดาษกรอง Whatman # 2 ขนาด 1 x 1.5 ซม. ใส่ลงไปในหลอดทดสอบ เจาะรูที่ฝาเพื่อให้อากาศ และนำไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของ *S. thailandense* n. sp. จำนวน 100+10 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองในหลอดทดสอบ จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้งน้ำหนัก

2.2-2.5 กรัม ใส่ 1 ตัวต่อ 1 หลอดทดสอบ ปฏิบัติจำนวน 20 หลอดทดสอบ และเก็บที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ นำหนอนมาผ่า ทุก 24 ชม. จำนวน 5 หลอดทดสอบ บันทึกผลช่วงเวลาการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยตั้งแต่เริ่มเข้าสู่ตัวหนอน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะต่างๆ ช่วงการผสมพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมีย การวางไข่และลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ จนครบ 1 วงจรชีวิต และทำการวัดขนาดความยาวลำตัวของไส้เดือนฝอยระยะต่างๆ (n=10) โดยใช้ stage micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM

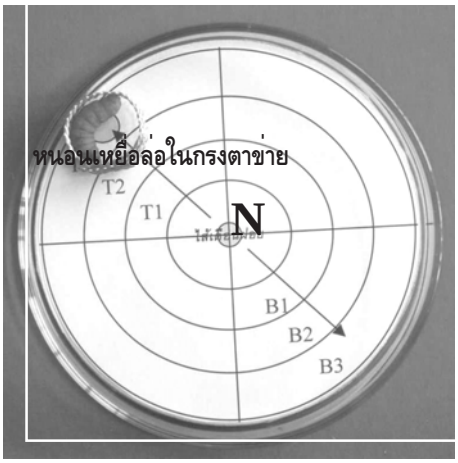
3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิต

นำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*S. thailandensis* n. sp.) และสายพันธุ์ต่างประเทศ (*S. carpocapsae*) ระยะ IJ จำนวนสายพันธุ์ละ 300+30 ตัว อยู่ในน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ แบ่งแยกแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นใส่หนอนกินรังผึ้ง จำนวน 10 ตัวต่อจาน นำไปวางที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 และ 38 °ซ นำหนอนที่ถูกเข้าทำลายในแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ มาผ่าจำนวนสายพันธุ์ละ 3 ตัว (ซ้ำ) ที่เวลา 24 48 72 96 120 และ 144 ชม. บันทึกการเจริญเติบโตและนับจำนวนแต่ละระยะของไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM คำนวณเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยในแต่ละช่วงเวลา

3.3 การตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธีเพื่อการคัดเลือกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย

3.3.1 Quadrant plate bioassay (ดัดแปลงจาก Campbell, 1994)

ตัดกระดาษเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. นำมาขีดเส้นแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน และขีดวงกลมจำนวน 3 วง ระยะห่าง 1 ซม. นำไปวางใต้จานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเท 2 % agar ปริมาตร 30 มล. ในจาน เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะวุ้นที่ริมจานและวางกรงตาข่ายทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ที่บรรจุหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว เป็นเหยื่อล่อ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 วิธีการทดสอบ quadrant plate bioassay (ดัดแปลงจาก Campbell, 1994)

ปฏิบัติการทดลองโดยหยดไส้เดือนฝอยระยะ IJ ของ *S. thailandense* n. sp. และ *S. carpocapsae* จำนวน (N) ชนิดละ 100 ตัวต่อจาน ที่อยู่ในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร ณ จุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อ บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ (T1 T2 และ T3) และจำนวนไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม (B1 B2 และ B3) ที่เวลา 10 20 และ 30 นาที ของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM ทำซ้ำ 5 ครั้ง คำนวณค่าระยะทางเฉลี่ย (mean distance, $\overline{\chi}$) ของการเคลื่อนที่โดยใช้สูตรของ Campbell (1994)

$$\overline{\chi} = \frac{[(10xT1)+(20xT2)+(30xT3)] - [(10xB1)+(20xB2)+(30xB3)]}{N}$$

3.3.2 Migration in sand column bioassay (ดัดแปลงจาก Westerman and Godthelp, 1990) นำหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว วางในกระบอกพลาสติกทรงกลม (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 5 ซม.) บรรจุทรายอบฆ่าเชื้อที่มีความชื้น 10 % ให้เต็มกระบอก หยดไส้เดือนฝอย IJ ของ *S. thailandense* n. sp. และ *S. carpocapsae* จำนวนชนิดละ 100+10 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร บนผิวหน้าดินทราย และหยดน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร เป็น control ทดสอบชนิดละ 10 ซ้ำ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25+2°ซ เป็นเวลา 5 วัน บันทึกการตายของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดเข้าทำลายเปรียบเทียบกับ control และผ่าซากหนอนตรวจหาไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM

3.3.3 Nematode tolerance bioassays (ดัดแปลงจาก Glazer, 1994) แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้ :-

3.3.3.1 Heat tolerance การวางไส้เดือนฝอย IJ ของ *S. thailandense* n. sp. และ *S. carpocapsae* ที่อุณหภูมิ 6 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 และ 40°ซ

3.3.3.2 Exposure to sunlight การวางไส้เดือนฝอย IJ ของ *S. thailandense* n. sp. และ *S. carpocapsae* ที่ช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ ช่วงเวลา 6-7 7-8 8-9 9-10 16-17 และ 17-18 นาฬิกา

นำดินทรายอบฆ่าเชื้อที่มีความชื้น 10 % ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. น้ำหนักดิน 10 กรัมต่อจาน จำนวน 24 จาน พ่นไส้เดือนฝอย IJ แต่ละชนิด จำนวน 1,000+100 ตัว ที่ผิวหน้าดินทราย ชนิดละ 12 จาน แบ่งเป็น 2 ชุด

ชุดที่ 1 นำไปวางที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิตามการทดลองย่อยข้อที่ 3.3.3.1 เป็นเวลา 24 ชม.

ชุดที่ 2 นำไปวางกลางแจ้งตามการทดลองย่อยข้อที่ 3.3.3.2 เป็นเวลา 1 ชม.

หลังจากเวลาที่กำหนดในแต่ละชุด นำหนอนกินรังผึ้งใส่ลงไป 10 ตัวต่อจาน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25+2 °ซ เป็นเวลา 5 วัน บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกินรังผึ้งในแต่ละระดับอุณหภูมิและช่วงเวลา

4. การขยายปริมาณไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *S. thailandense* n. sp. ในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว

4.1 การศึกษาสูตรอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว

4.1.1 การเตรียมไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ระยะ IJ ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินรังผึ้งเป็นเวลา 10 วัน ได้ไส้เดือนฝอย IJ รุ่นใหม่ นำมาล้างด้วย 0.1 % hyamine เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บไว้ในขวดชนิด culture flask ที่อุณหภูมิ 25+2 °ซ เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

4.1.2 การเตรียม symbiotic bacteria แยกเชื้อจากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. โดยใช้เทคนิคของ Akhurst (1980) streak บนอาหาร NBTA (37 g standard-I-nutrient agar, 25 mg bromthymol blue, 1,000 ml distilled water, 4 ml sterile filtrate 1 % 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride solution) แยกโคโลนีเดี่ยวเก็บเป็น stock culture ในหลอดอาหาร nutrient agar (8 g nutrient broth, 15 g agar, 1,000 ml distilled water) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-10 °ซ

เขี่ยแบคทีเรียจาก stock culture ที่เก็บไว้ไม่เกิน 30 วัน 1 ลูป ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeryer flask) ขนาด 125 มล. ที่มีอาหารชนิด nutrient broth (8 g Bacto nutrient broth, 1,000 ml distilled water) ปริมาตร 15 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงร่วมกับไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมสภาพ monoxenic culture

4.1.3 การเตรียมอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว ผสมอาหารสูตรดัดแปลง 14 สูตร วัด pH อาหาร และคำนวณต้นทุนอาหารต่อลิตร ดังนี้ :-

อาหารดัดแปลง	ส่วนผสมอาหาร	pH	ราคาบาท/100 กรัม
สูตร NT1	แป้งถั่วเหลือง 25 % น้ำมันหมู 10 % น้ำกลั่น 65 %	6.49	1.71
สูตร NT2	แป้งถั่วเหลือง 50 % น้ำมันหมู 20 % น้ำกลั่น 30 %	6.54	3.42
สูตร NT3	นมผง 25 % น้ำมันหมู 10 % น้ำกลั่น 65 %	6.34	4.21
สูตร NT4	นมผง 50 % น้ำมันหมู 20 % น้ำกลั่น 30 %	6.11	8.42
สูตร NT5	อาหารสุนัข 25 % น้ำมันหมู 10 % น้ำกลั่น 65 %	5.18	2.09
สูตร NT6	อาหารสุนัข 50 % น้ำมันหมู 20 % น้ำกลั่น 30 %	5.12	4.15
สูตร NT7	นมถั่วเหลือง 90 % น้ำมันหมู 10 %	6.47	1.78
สูตร NT8	นมถั่วเหลือง (ไวตามิ้ลค์) 90 % น้ำมันหมู 10 %	6.86	2.56
สูตร NT9	หัวใจไก่ 25 % น้ำมันหมู 10 % น้ำกลั่น 65 %	6.37	1.71
สูตร NT10	หัวใจไก่ 50 % น้ำมันหมู 20 % น้ำกลั่น 30 %	6.31	3.42
สูตร NT11	ไส้ไก่ 25 % น้ำมันหมู 10 % น้ำกลั่น 65 %	6.06	1.18
สูตร NT12	ไส้ไก่ 50 % น้ำมันหมู 20 % น้ำกลั่น 30 %	6.00	2.35
สูตร NT13	ไตหมู 25 % น้ำมันหมู 10 % น้ำกลั่น 65 %	6.66	2.96
สูตร NT14	ไตหมู 50 % น้ำมันหมู 20 % น้ำกลั่น 30 %	6.61	5.92

นำอาหารแต่ละสูตรคลุกกับฟองน้ำ (ขนาดลูกเต๋า) บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. ในอัตราอาหาร 25 กรัม ต่อฟองน้ำ น้ำหนัก 1.5 กรัม นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

4.1.4 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย นำแบคทีเรียที่เลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์จากอาหาร nutrient broth จำนวน 10^7 เซลล์ โดยใช้วิธีตรวจนับเซลล์ด้วย counting chamber จากนั้นนำไปหยดลงบนอาหารสูตรต่างๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียเจริญบนอาหาร หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอย IJ ที่เตรียมไว้จำนวน 20,000+2,000 ตัวต่อขวดที่บรรจุอาหารสูตรต่างๆ ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณ เป็นเวลา 7 วัน

4.1.5 การแยกล้างผลผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหาร ปฏิบัติโดยขยำฟองน้ำของแต่ละสูตรอาหารในน้ำสะอาด 3 ครั้ง ให้ไส้เดือนฝอยหลุดออกจากชิ้นฟองน้ำ ตั้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้งและเติมน้ำสะอาดทำซ้ำ ให้ได้ไส้เดือนฝอยในน้ำใส

4.1.6 การทดสอบศักยภาพในการกำจัดแมลง (quality control, QC) เตรียมจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์ กลาง 9 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ ทำการใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ ที่เพาะเลี้ยงจากอาหารแข็งกึ่งเหลว 14 สูตร เปรียบเทียบกับ IJ ที่เพาะเลี้ยงจากหนอน (host) อย่างละ 200 ตัวต่อจาน จากนั้นวางหนอนกินรังผึ้งจำนวน 10 ตัวในแต่ละจาน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

การบันทึกผล

1) จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย โดยตรวจนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM จำนวน 4 ซ้ำต่อสูตรอาหาร คำนวณค่าเฉลี่ยผลผลิตและต้นทุนอาหารต่อลิตร

2) ศักยภาพของไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากอาหารสูตรต่างๆ และไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากแมลงอาศัย โดยนับจำนวนหนอนทดสอบตาย และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในแต่ละสูตรอาหาร

4.2 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว

4.2.1 การศึกษาผลของระดับ pH ในการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหาร 3 สูตร

วางแผนการทดลองแบบ CRD 8 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ของสูตรอาหาร SBSM DFSM และ KDSM ระดับ pH 8 ระดับ (กรรมวิธี) คือ 3 4 5 6 7 8 9 และไม่ปรับ pH (control)

เตรียมอาหารแข็งกึ่งเหลว 3 สูตร คือ SBSM (NT8) DFSM (NT5) และ KDSM (NT14) ปรับระดับ pH โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ในแต่ละสูตรอาหารตามกรรมวิธีกำหนด นำอาหารแต่ละสูตรผสมกับฟองน้ำ (ขนาดลูกเต๋า) อัตราอาหาร 25 กรัม : ฟองน้ำหนัก 1.5 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์ บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 20,000+2,000 ตัวต่อขวด นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ

26+2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจนับผลผลิตไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM ในแต่ละกรรมวิธีของสูตรอาหาร 3 สูตร คำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติและเปรียบเทียบคู่เฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเพิ่มปริมาณของไส้เดือนฝอยในอาหาร 3 สูตร

วางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ของสูตรอาหาร SBSM DFSM และ KDSM ระดับอุณหภูมิ 6 ระดับ (กรรมวิธี) คือ 15 20 25 30 35 และอุณหภูมิ 26+2 °ซ (control)

เตรียมอาหารแข็งกึ่งเหลว 3 สูตร คือ SBSM (NT8) DFSM (NT5) และ KDSM (NT14) นำอาหารแต่ละสูตรผสมกับฟองน้ำ (ขนาดลูกเต๋า) อัตราอาหาร 25 กรัม : ฟองน้ำหนัก 1.5 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์ บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้น ใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 20,000+2,000 ตัวต่อขวด นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ ตามกรรมวิธีกำหนด เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจนับผลผลิตไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM ในแต่ละกรรมวิธี ของสูตรอาหาร 3 สูตร คำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติและเปรียบเทียบคู่เฉลี่ยโดยวิธี DMRT

4.2.3 ศึกษาอิทธิพลของแสงขณะเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหาร 3 สูตร

วางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ของสูตรอาหาร SBSM DFSM และ KDSM สภาพของแสง 3 สภาพ (กรรมวิธี) คือ มีแสง ที่มืด และแสงสลับปกติ (control)

เตรียมอาหารแข็งกึ่งเหลว 3 สูตร คือ SBSM (NT8) DFSM (NT5) และ KDSM (NT14) นำอาหารผสมกับฟองน้ำ (ขนาดลูกเต๋า) อัตราอาหาร 25 กรัม : ฟองน้ำหนัก 1.5 กรัม บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที หยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์ บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 20,000+2,000 ตัวต่อขวด นำขวดเพาะเลี้ยงวางตามกรรมวิธีกำหนดที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจนับผลผลิตไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM ในแต่ละกรรมวิธีของสูตรอาหาร 3 สูตร คำนวณค่าความแตกต่างทางสถิติและเปรียบเทียบคู่เฉลี่ยโดยวิธี DMRT

เวลาและสถานที่

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา และสำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและนิวเคลียร์เทคนิค กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลา 6 ปี เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2541 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2547

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate

1.1 การเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยเพื่ออนุรักษ์และนำไปใช้ประโยชน์

ผลการจัดเก็บและรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate ที่แยกได้จากดินใน 11 พื้นที่ของประเทศไทย จัดระบบโดยกำหนดรหัสไส้เดือนฝอย (nema code) ด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ภาษาอังกฤษ ย่อตามชื่อจังหวัดจำนวน 2 ตัวอักษร ให้ชื่อรหัสดังนี้ :- *S. thailandense* n.sp. KB code (แหล่งเก็บ : **K**anchana**b**uri) PC code (แหล่งเก็บ : **P**hi**c**hit) AY code (แหล่งเก็บ : **A**yuthha**y**a) KS code (แหล่งเก็บ : **K**ala**s**in) MK code (แหล่งเก็บ : **M**ahasara**k**ham) KK code (แหล่งเก็บ : **K**hon **K**aen) NK code (แหล่งเก็บ : **N**ong**k**hai) SK code (แหล่งเก็บ : **S**a**k**aeo) NN code (แหล่งเก็บ : **N**akhon Pa**n**om) REs code[1/] (แหล่งเก็บ : **R**oi**e**t) และ UBs code[1/] (แหล่งเก็บ : **Ub**on Ratchathane) บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ เดือน/ปีที่เก็บ ชนิดพืช บริเวณจุดเก็บ อุณหภูมิดิน และ pH ดิน ของแต่ละไอโซเลท (ตารางที่ 1) ไส้เดือนฝอยที่แยกได้ในแต่ละพื้นที่จัดเก็บใน culture flask ขนาดความจุปริมาตร 250 มล. รวบรวมเฉพาะไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile จำนวน 50,000+5,000 ตัว ในน้ำกลั่น 25 มล. มีจำนวนความหนาแน่นเฉลี่ยเท่ากับ 2,000 ตัวต่อน้ำกลั่น 1 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 25+2 °ซ และทำการ re-culture แต่ละรหัสทุกๆ 3 เดือน เพื่อได้ไส้เดือนฝอยรุ่นใหม่ที่แข็งแรง (ภาพที่ 2)

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (entomopathogenic nematode) ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ได้รวบรวมไว้ ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ ซึ่งเป็นแหล่งจัดเก็บไส้เดือนฝอย Thai isolate แห่งแรกของประเทศไทย ในปัจจุบันมีไส้เดือนฝอย Thai steinernematid จำนวน 11 ไอโซเลท และยังรวบรวม Thai heterorhabditid จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด (REh code[1/]) และอุบลราชธานี (UBh code[1/]) รวมทั้งหมด 13 ไอโซเลท รวบรวมเพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ไทย (Thai strain) ในการนำมาศึกษาด้านการจัดจำแนกชนิด ชีววิทยา นิเวศวิทยา และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีไปขยายปริมาณในอาหารเทียมให้สามารถขยายผลในเชิงพาณิชย์ เพื่อนำไปใช้กำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี

นอกจากนั้น ได้เก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยสายพันธุ์จากต่างประเทศอื่นๆ ได้แก่ *S. carpocapsae, S. feltiae* และ *S. glaseri* (ได้รับจาก Dr. Mutsuhiro Yoshida, NIAES, Japan เมื่อปี พ.ศ. 2541) *S. riobrave, S. scapterisci, Heterorhabditis bacteriophora* และ *H. marelata* (ได้รับจาก Dr. Randy Gaugler, Rutgers Univ., USA เมื่อปี พ.ศ. 2542) ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยที่ใช้กำจัดแมลงและผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศที่เก็บรวบรวมไว้เหล่านี้ จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์ไทย โดยเฉพาะการคัดเลือกสายพันธุ์ไทยเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ ซึ่งสายพันธุ์การค้าจะเป็นตัวชี้วัดศักยภาพของสายพันธุ์ไทยในการคัดเลือกมาผลิตใช้เป็น bio-pesticide ต่อไป ตลอดจนการนำสายพันธุ์ต่างประเทศชนิดอื่นที่มีศักยภาพมาพัฒนาใช้ในประเทศ เพื่อเพิ่มทางเลือกในการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีความหลากหลายในเขตร้อนชื้นในอนาคต

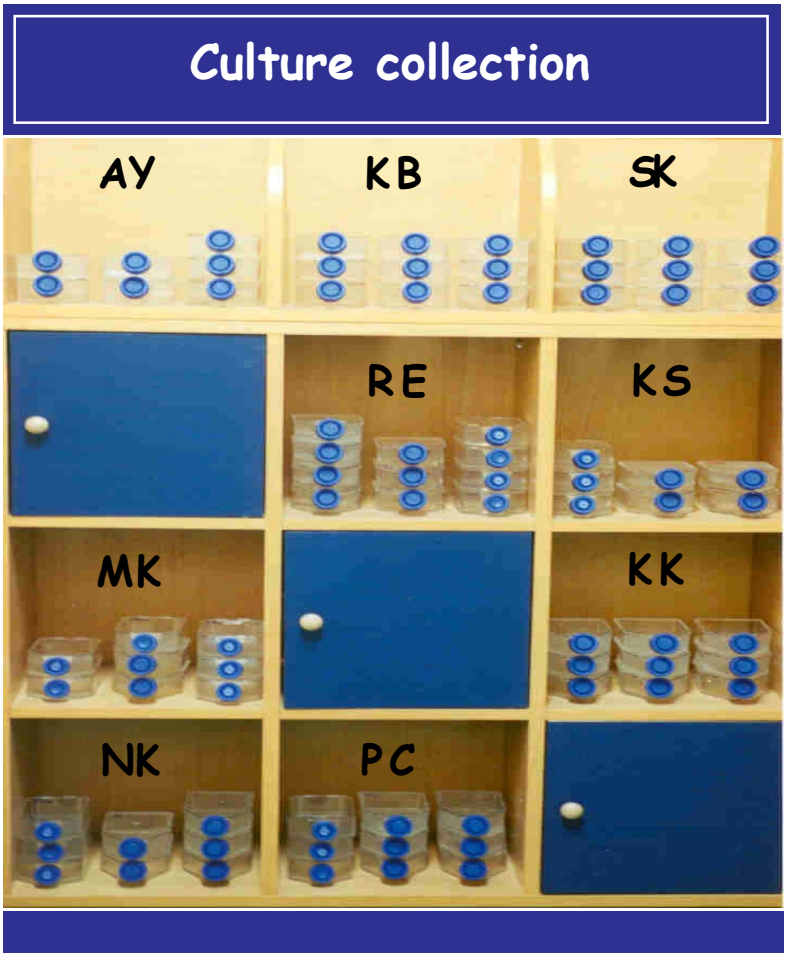
[1/] REs code, UBs code = steinernematid แยกได้จากร้อยเอ็ดและอุบลราชธานี ; REh code, UBh code = heterorhabditid แยกได้จากร้อยเอ็ดและอุบลราชธานี

ตารางที่ 1 ไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เก็บรวบรวมในน้ำกลั่น กำหนดรหัสไส้เดือนฝอย และบันทึกข้อมูล สถานที่เก็บ เดือน-ปีที่เก็บ ชนิดพืช อุณหภูมิดิน ณ จุดเก็บ และ pH ดิน

รหัสไส้เดือนฝอย	สถานที่เก็บ	เดือน-ปีที่เก็บ	ชนิดพืช (บริเวณที่เก็บ)	อุณหภูมิดิน ณ จุดเก็บ	PH ดิน
KB code[1/]	กาญจนบุรี	ธันวาคม 2539	มะพร้าว (แปลงปลูก)	27.0	7.2
PC code	พิจิตร	กุมภาพันธ์ 2540	พริกไทย (แปลงปลูก)	24.0	7.1
AY code	พระนครศรีอยุธยา	มีนาคม 2540	มะลิ (แปลงปลูก)	28.0	6.8
KS code	กาฬสินธุ์	กรกฎาคม 2540	หญ้า (ข้างทาง)	28.0	7.5
MK code	มหาสารคาม	กรกฎาคม 2540	วัชพืช (ข้างทาง)	29.0	7.3
KK code	ขอนแก่น	กรกฎาคม 2540	หญ้า (ข้างทาง)	25.0	7.4
NK code	หนองคาย	กรกฎาคม 2540	วัชพืช (ข้างทาง)	27.0	7.4
SK code	สระแก้ว	กุมภาพันธ์ 2541	ฝรั่ง (แปลงปลูก)	25.0	7.1
NN code	นครพนม	สิงหาคม 2542	ดาวเรือง (แปลงปลูก)	28.0	7.2
REs code[2/]	ร้อยเอ็ด	ตุลาคม 2543	วัชพืช (ในป่า)	27.5	7.2
UBs code[3/]	อุบลราชธานี	พฤศจิกายน 2543	วัชพืช (ในป่า)	26.5	7.1

[1/]KB code = *S. thailandense* n. sp.

[2/, 3/]REs และ UBs = ชื่อย่อจังหวัดร้อยเอ็ดและอุบลราชธานี ตามด้วยตัวอักษร s (ตัวพิมพ์เล็ก) โดย s หมายถึง ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema*



ภาพที่ 2 การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย steinernematid ที่แยกได้จากดินใน 11 พื้นที่ของประเทศไทย

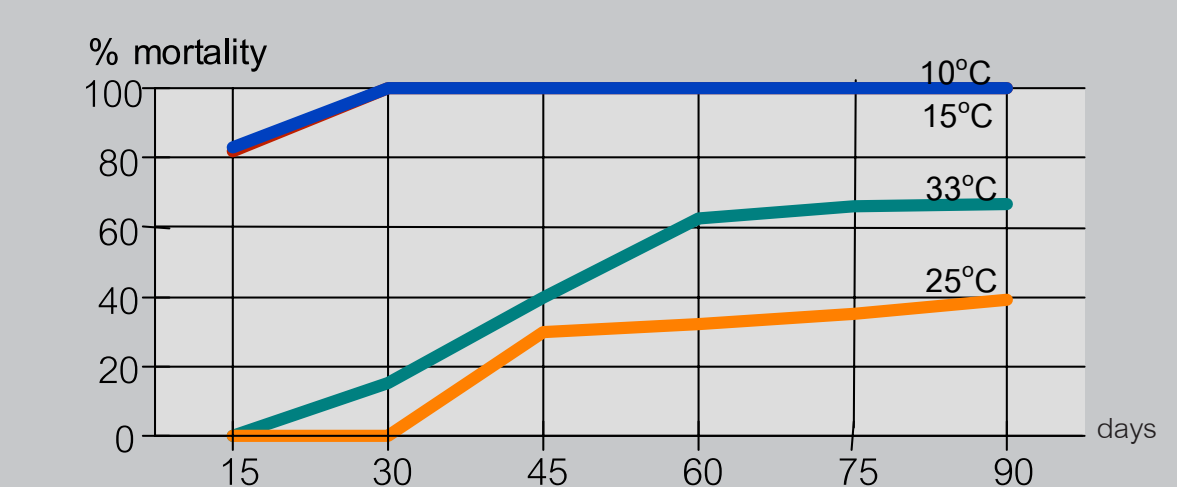
1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

ผลการศึกษาระดับของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. Thai isolate พบว่า ระดับของอุณหภูมิมีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในน้ำกลั่นให้คงความมีชีวิตรอดได้แตกต่างกัน ผลการทดลองมีความแตกต่างทางสถิติ โดยพบว่าการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 °ซ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้นานที่สุด 90 วัน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุดเท่ากับ 39 % รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 33 °ซ ไส้เดือนฝอยตาย 66.7 % ในเวลาเท่ากัน แต่การเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 และ 15 °ซ ไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ไม่สามารถมีชีวิตรอดเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 15 วัน ซึ่งพบว่า ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงเท่ากับ 83.3 และ 82.0 % ตามลำดับ (ภาพที่ 3)

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย Thai isolate ให้คงสภาพความชีวิตและยังมีศักยภาพในการเป็น bio-control agent นั้น อุณหภูมิของการเก็บรักษาจึงเป็นปัจจัยสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอย อิทธิพลของอุณหภูมิต่ำ (10 °ซ) และสูง (33 °ซ) แสดงให้เห็นความแตกต่างในการเก็บรักษา culture โดยอุณหภูมิที่ต่ำไม่สามารถคงสภาพความมีชีวิตของไส้เดือนฝอย Thai steinernematid แต่การเก็บที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 °ซ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้นานกว่า ซึ่งเมื่อเทียบกับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศและผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน (*S. carpocapsae*) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บอยู่ที่ 4-10 °ซ (Kaya and Stock, 1988) ข้อมูลที่ได้นี้สนับสนุนงานด้านการจัดจำแนกชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ที่เป็น “Tolerant of higher temperature and less tolerant of lower temperature” และเป็นข้อพิจารณาประการหนึ่งในการจะนำสายพันธุ์ไทยไปใช้เป็น bio-control agent เพื่อการค้าในเรื่องของการขนส่งและเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ก่อนนำไปใช้ในไร่-นา ซึ่งไม่มีความจำเป็นต้องเก็บรักษาหรือขนส่งในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (4-10 °ซ) นอกจากนั้นคุณสมบัติของการทนร้อนนี้เป็นข้อดีในด้านศักยภาพของการฆ่าแมลงศัตรูพืชในเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิสูง เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่แยกได้จากรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา (Cabanillas *et al.*, 1994) และ *S. abbasi* จากประเทศโอมาน (Elawad *et al.*, 1997) ซึ่งไส้เดือนฝอยทั้งสองชนิดนี้ ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์การค้าเพื่อนำไปควบคุมแมลงในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงในโซนอเมริกา

อย่างไรก็ตาม ความทนร้อนหรืออยู่ได้ในอุณหภูมิที่สูงของไส้เดือนฝอย Thai isolate นั้น เก็บรักษาในน้ำกลั่นได้ประมาณ 3 เดือน ต้องมีการถ่ายเชื้อใหม่ เนื่องจากการอยู่ในน้ำซึ่งเป็นของเหลว ไส้เดือนฝอยมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา มีการใช้พลังงานทำให้อาหารสำรอง (food reserve) สูญเสียหรือหมดไปเร็ว ไส้เดือนฝอยจะอ่อนแอและศักยภาพในการทำลายลดลง แตกต่างจากไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศที่เก็บในน้ำที่อุณหภูมิต่ำ (4-10 °ซ) อุณหภูมิต่ำจะทำให้ไส้เดือนฝอยมีการเคลื่อนไหวน้อยถึงหยุดนิ่ง จึงทำให้ไม่สูญเสียพลังงานและอาหารสำรอง สามารถเก็บรักษาในน้ำได้นานเป็นปี

ผลการทดลองที่ได้นี้ เป็นแหล่งข้อมูลความรู้ทางชีววิทยาที่สำคัญในการจะพัฒนาสายพันธุ์ไทยไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะในเรื่องของการเก็บรักษาและรูปแบบของผลิตภัณฑ์ (formulation) ซึ่งต้องมีการศึกษาโดยใช้ผลการทดลองนี้เป็นข้อพิจารณา เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยประสบผลสำเร็จในการขนส่งและจำหน่ายต่อไป



10°C	83.3 a[1/]	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
15°C	82.0 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
25°C	0 b	0 c	27.9 c	32.0 c	35.3 c	39.0 c
33°C	0 b	15.3 b	39.7 b	62.7 b	66.3 b	66.7 b

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % คำนวณโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. เก็บที่อุณหภูมิ 10 15 25 และ 33 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจนับทุก 15 วัน เป็นเวลา 90 วัน

2. การจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย Thai isolate

2.1 การจัดจำแนกไส้เดือนฝอยโดยวิธีผสมข้ามชนิด (cross mating)

การทดสอบ cross mating ของไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. ที่แยกได้จากดินในจังหวัดพิจิตร (PC code) พระนครศรีอยุธยา (AY code) กาฬสินธุ์ (KS code) มหาสารคาม (MK code) ขอนแก่น (KK code) หนองคาย (NK code) สระแก้ว (SK code) นครพนม (NN code) ร้อยเอ็ด (REs code) และอุบลราชธานี (UBs code) ผสมข้ามกับไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp., *S. carpocapsae* All strain และ *S. feltiae* พบว่าตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียที่แยกได้จากดินในรหัส KS MK KK NK NN และ REs มีการผสมพันธุ์ข้ามและให้ลูกรุ่นใหม่ได้ และผสมข้ามได้กับ *S. thailandensis* n. sp. แต่ไม่มีการผสมพันธุ์และวางไข่กับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* และ *S. feltiae* ซึ่งเป็นสายพันธุ์จากต่างประเทศ ภายในเวลา 10 วัน ที่ทำการตรวจสอบ (ตารางที่ 2)

ส่วนไส้เดือนฝอยในรหัส PC สามารถผสมได้กับ *S. carpocapsae* แต่ไม่ผสมกับไส้เดือนฝอยชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบในภายหลังพบว่า ในตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่จังหวัดพิจิตรนั้น เป็นแปลงปลูกพริกไทย และเคยมีการใช้ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์อเมริกา ดังนั้น ไส้เดือนฝอยรหัส PC จึงไม่ใช่ Thai isolate แต่เป็นชนิดเดียวกับ *S. carpocapsae* และ/หรือเป็นไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่มีการใช้ควบคุมแมลงในพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างดิน ซึ่งไส้เดือนฝอยยังคงมีชีวิตอยู่ในดินบริเวณนั้นๆ

ส่วนไส้เดือนฝอยในรหัส AY SK และ UBs ไม่ผสมข้ามกับไส้เดือนฝอยรหัส KS MK KK NK NN REs *S. thailandense* n. sp. และสายพันธุ์จากต่างประเทศทั้งสองชนิด รวมทั้ง AY SK และ UBs ก็ไม่สามารถผสมข้ามกันได้

เทคนิคการทำ cross mating เป็นการแบ่งแยกชนิดในเบื้องต้นที่ได้รับการยอมรับ (Kaya and Stock, 1988) เป็นวิธีการที่ง่าย ไม่สิ้นเปลืองวัสดุ-อุปกรณ์และสารเคมี จึงเหมาะที่จะนำมาแบ่งแยกไอโซเลทที่แยกได้จากเขตหรือโซนเดียวกัน ผลการทดสอบ cross mating จึงสามารถแบ่งแยกไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในประเทศไทยออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 1) KS MK KK NK NN REs และ *S. thailandense* n. sp. 2) AY 3) SK และ 4) UBs การทดสอบปฏิบัติซ้ำ 3 ครั้ง ให้ผลการทดลองที่ชัดเจนของการแบ่งแยกชนิดโดยการทดสอบด้วยวิธี cross mating จึงเป็นการจัดกลุ่มหรือชนิดก่อนการจัดจำแนกด้วยวิธีการอื่นๆ ต่อไป

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการผสมข้าม (cross mating) ระหว่างไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในประเทศไทย จำนวน 1 ชนิด 10 ไอโซเลท (code) คือ *Steinernema thailandense* n. sp. PC AY SK UBs KS MK KK NK NN และ REs code กับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์จากต่างประเทศ 2 ชนิด คือ *S. carpocapsae* และ *S. feltiae*

			Steinernema sp. Thai isolate (code)										
	S. feltiae	*S. carpocapsae*	PC	AY	SK	UBs	*S. thailandense*	KS	MK	KK	NK	NN	REs
S. feltiae	+												
S. carpocapsae	-	+	+										
Steinernema sp. PC code	-	+	+										
Steinernema sp. AY code	-	-	-	+									
Steinernema sp. SK code	-	-	-	-	+								
Steinernema sp. UBs code	-	-	-	-	-	+							
S. thailandense	-	-	-	-	-	-	+						
Steinernema sp. KS code	-	-	-	-	-	-	+	+					
Steinernema sp. MK code	-	-	-	-	-	-	+	+	+				
Steinernema sp. KK code	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+			
Steinernema sp. NK code	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+		
Steinernema sp. NN code	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
Steinernema sp. REs code	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + คือ มีการผสมข้าม ; เครื่องหมาย - คือ ไม่มีการผสมข้าม

2.2 การใช้เทคนิค PCR-RFLP ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอย

จากผล RFLP pattern ของดีเอ็นเอในไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ไอโซเลท SK AY และ PC เปรียบเทียบกับ pattern ของไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. และ *S. carpocapsae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 9 ชนิด พบว่า ในเอนไซม์ *Alu* I ตัดดีเอ็นเอของไอโซเลท AY และ SK แสดงจำนวนแถบและขนาดของดีเอ็นเอบนแผ่นเจลเหมือนกัน แต่แตกต่างจาก *S. thailandense* n. sp. และ *S. carpocapsae* ส่วนไอโซเลท PC เหมือนกับ pattern ของ *S. carpocapsae* และในเอนไซม์ *Dde* I และ *Hha* I พบว่า ไส้เดือนฝอยทุกไอโซเลทไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4A)

ใน RFLP pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III พบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY และ SK มีจำนวนแถบและขนาดของดีเอ็นเอเหมือนกับ *S. thailandense* n. sp. และไอโซเลท PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ในเอนไซม์ *Hinf* I พบว่า ไอโซเลท AY แตกต่างจากทุกไอโซเลท ส่วนในเอนไซม์ *Hpa* I เหมือนกันทุกไอโซเลท (ภาพที่ 4B)

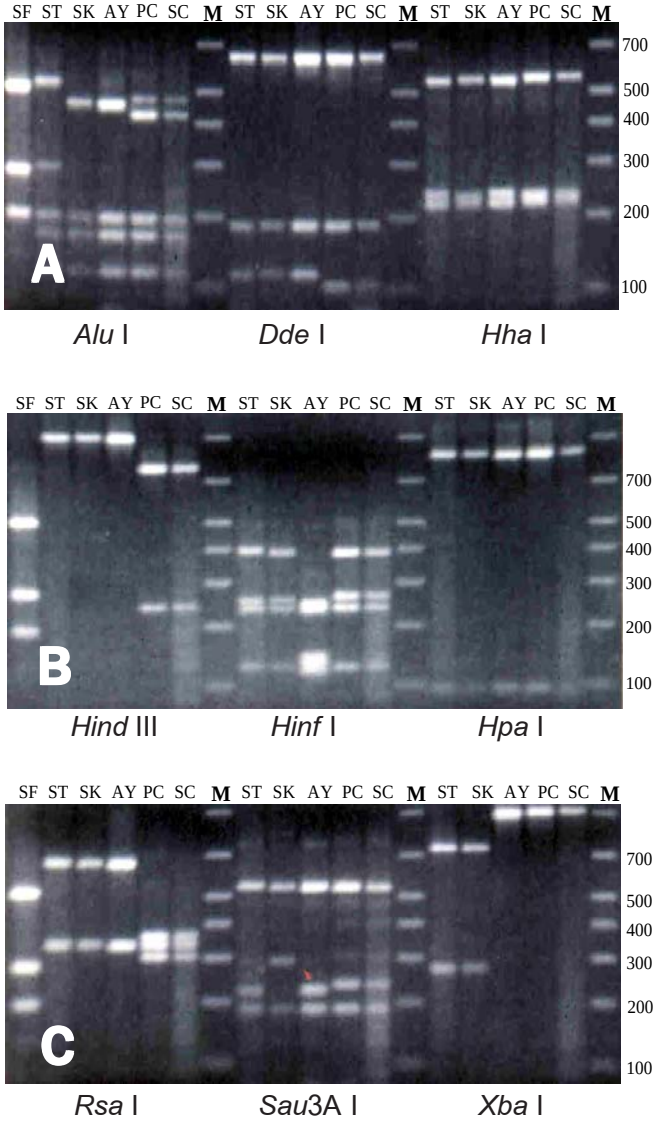
ในเอนไซม์ *Rsa* I พบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY และ SK เหมือนกับ *S. thailandense* n. sp. เช่น เดียวกับไอโซเลท PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ส่วนในเอนไซม์ *Sau3A* I ไอโซเลท SK แตกต่างจากทุกไอโซเลท สำหรับในเอนไซม์ *Xba* I ไอโซเลท SK เหมือนกับ *S. thailandense* n. sp. และไอโซเลท AY PC และ SC เหมือนกัน (ภาพที่ 4C)

จำนวนแถบบนแผ่นเจลและขนาดของดีเอ็นเอ แสดงถึงความแตกต่างในระดับยีนของไส้เดือนฝอยในแต่ละไอโซเลท โดยขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่นำมาตัด ณ ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) ของ ribosomal DNA (Joyce *et al.,* 1994) จาก RFLP pattern ที่ตัดด้วยเอนไซม์ 9 ชนิด พบว่า มีเอนไซม์ 3 ชนิด ไม่สามารถแบ่งแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอในไอโซเลทที่นำมาตรวจสอบได้คือ *Dde* I *Hha* I และ *Hpa* I ส่วนในเอนไซม์ *Rsa* I และ *Hind* III สามารถแบ่งแยกดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยออกเป็น 2 กลุ่ม โดยไอโซเลท AY และ SK เหมือนกับ *S. thailandense* n.sp. และไอโซเลท PC เหมือนกับ *S. carpocapsae* ส่วนชนิดของเอนไซม์ที่แบ่งแยกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทออกจากกัน ได้แก่ *Alu* I *Hinf* I *Sau3A* I และ *Xba* I ซึ่งสามารถให้คำตอบของความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่แยกได้ในแต่ละไอโซเลทได้อย่างชัดเจน โดยเอนไซม์ *Alu* I แบ่งแยก AY และ SK ออกจาก *S. thailandense* n. sp. และเอนไซม์ *Hinf* I และ *Sau*3A I แบ่งแยกไอโซเลท AY ออกจาก SK ดังนั้น ไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY ไม่ใช่ชนิดเดียวกับไอโซเลท SK และ *S. thailandense* n.sp. ส่วนไอโซเลท SK แตกต่างจาก *S. thailandense* n. sp. เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I และ *Sau*3A I

สำหรับไอโซเลท PC พบว่า การตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 9 ชนิด ให้ RFLP pattern ที่เหมือนกับ *S. carpocapsae* จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดเดียวกัน และการแบ่งแยกไอโซเลท PC ออกจาก AY SK และ *S. thailandense* n. sp. พบว่า RFLP pattern แสดงให้เห็นความแตกต่างของดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I *Hind* III และ *Rsa* I

การวิเคราะห์ผลในการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยด้วยเทคนิค PCR-RFLP ให้คำตอบของความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระบบ ecosystem โดยไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย ยังมีความแตกต่างของยีนที่สามารถตรวจสอบด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา ที่ให้คำตอบแม่นยำและรวดเร็ว ผลของความแตกต่างของยีนเป็นข้อมูลยืนยันการแบ่งแยกไส้เดือนฝอยในแต่ละไอโซเลท ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยาและสระแก้ว มีความแตกต่างของยีนจาก *S. thailandense* n. sp. ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี ซึ่ง *S. thailandense* n. sp. นี้ยังแยกจากไส้เดือนฝอย *S. siamkayai* ที่แยกได้จากจังหวัดเพชรบูรณ์ (Stock *et al.*, 1997) โดยมีความแตกต่างของจำนวนแถบและขนาดของดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 8 เอนไซม์ คือ *Alu* I *Dde* I *Eco*R I *Hha* I *Hinf* I *Rsa* I *Sau*96 I และ *Xba* I ดังนั้น ไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. จึงแยกจาก *S. siamkayai* โดยอาศัยความแม่นยำของเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล (Tangchitsomkid, 2000) รวมถึงไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY และ SK isolate ที่มีความแตกต่างของยีนเช่นกัน สอดคล้องกับรายงานการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย steinernematid ในประเทศญี่ปุ่น พบไส้เดือนฝอยที่มีความแตกต่างของดีเอ็นเอจำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากดินในแต่ละพื้นที่ที่มีความแตกต่างของสภาพอากาศและลักษณะทางภูมิศาสาตร์ (Yoshida *et al.*, 1988) เป็นความหลากหลายทางชีวภาพ (bio-diversity) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในโลกและรวมทั้งในประเทศไทย ที่น่าสนใจศึกษาและอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

ไส้เดือนฝอยไอโซเลท AY และ SK จึงมีแนวโน้มของการเป็น new species ซึ่งจะต้องมีการศึกษาทางด้านรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยา ประกอบการพิจารณาจัดจำแนกไส้เดือนฝอยชนิดใหม่ต่อไป



ภาพที่ 4 จำนวนแถบและขนาดดีเอ็นเอบนแผ่น agarose gel ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด ของไส้เดือนฝอย Thai isolate เปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ที่ทราบชนิด (species)

SF = *Steinernema feltiae* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I (ชนิดมาตรฐานเพื่อเป็นตัวตรวจสอบ)

ST = *S. thailandense* n. sp.

SK = ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดสระแก้ว (SK code)

AY = ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY code)

PC = ไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในพื้นที่จังหวัดพิจิตร (PC code)

SC = *S. carpocapsae*

M = ขนาดโมเลกุล (molecular weight)

3. การศึกษาชีววิทยาและการคัดเลือกไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. เพื่อการผลิต

3.1 ชีววิทยาของไส้เดือนฝอย

3.1.1 วงจรชีวิต

วงจรชีวิตในตัวหนอนแมลง (host) เริ่มจากตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile, IJ) ซึ่งเป็นระยะที่มีความทนทานและอยู่ภายนอกตัวหนอนโดยไม่กินอาหารได้เป็นเวลานาน จนกว่าจะเข้าไปภายในตัวหนอน ซึ่งเป็นแหล่งอาหาร จึงสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ ไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. มีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างด้วยการลอกคราบ 4 ครั้ง ประกอบด้วยระยะตัวอ่อน (juvenile stage) 4 ระยะ คือ ตัวอ่อนระยะที่ 1 (first-stage juvenile, J1) ตัวอ่อนระยะที่ 2 (second-stage juvenile, J2) ตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile, J3) หรือระยะเข้าทำลาย (IJ) และตัวอ่อนระยะที่ 4 (fourth-stage juvenile, J4) และเจริญเป็นตัวเต็มวัย (adult stage) ประกอบด้วยเพศเมีย (female) และเพศผู้ (male) มีการขยายพันธุ์แบบแยกเพศ (amphimictic) ผลการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. สายพันธุ์ไทย ภายในหนอนทดสอบ (*G. mellonella*) ใน 1 วงจรชีวิต จากตัวอ่อนระยะ IJ ถึง IJ ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เมื่อทำการใส่ไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ระยะ IJ ขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 437 (420-452) ไมครอน (ภาพที่ 5D) จำนวน 100+10 ตัวต่อ หนอนทดสอบ 1 ตัว ไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนตัวเข้าสู่ตัวหนอนได้ทางช่องเปิดธรรมชาติ ได้แก่ ปาก ช่องขับถ่าย หรือรูหายใจทางผิวหนัง และจากการผ่าหนอนทดสอบจำนวน 5 ซ้ำ (ตัว) ทุกๆ 24 ชม. พบการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ และตัวเต็มวัย มีการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้-เพศเมีย และให้ลูกรุ่นแรก ครบ 1 วงจรชีวิต ใช้เวลา 4 วัน (ภาพที่ 5A) ผลการศึกษาการพัฒนาของไส้เดือนฝอยภายในตัวหนอนทดสอบในแต่ละช่วงเวลา ผลการตรวจ ดังนี้ :-

ที่เวลา 24 ชม. หนอนทดสอบเคลื่อนที่ช้าถึงหยุดนิ่ง แสดงอาการอ่อนแอและบางตัวตาย เมื่อผ่าหนอนพบไส้เดือนฝอยรวมทั้งหมด 42 ตัว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายเท่ากับ 42 % มีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากระยะ IJ เป็น J4 สามารถนับจำนวนได้เท่ากับ 6 และ 34 ตัว ตามลำดับ โดย J4 มีขนาดความยาวลำตัวเป็น 2 เท่าของ IJ เฉลี่ยเท่ากับ 878 (892-865) ไมครอน (ภาพที่ 5E) และพบไส้เดือนฝอยเพศเมียแต่การสร้างรังไข่ยังไม่สมบูรณ์ จำนวนเฉลี่ย 2 ตัว ไม่พบเพศผู้

ที่เวลา 48 ชม. หนอนทดสอบตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และผิวลำตัวของหนอนที่ตายจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย เปลี่ยนเป็นสีดำ ภายในตัวหนอนพบไส้เดือนฝอยรวมทั้งหมด 47 ตัว แสดงว่า ไส้เดือนฝอย IJ ที่เหลืออยู่ ยังเคลื่อนที่เข้าสู่ตัวหนอนเพิ่มขึ้นอีกในช่วงเวลาหลังใส่ไส้เดือนฝอย 48 ชม. โดยเพิ่มเฉลี่ยเท่ากับ 5 ตัว ไส้เดือนฝอยมีการเจริญเติบโตแบ่งเป็นระยะต่างๆ คือ IJ J4 ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ เท่ากับ 9 11 15 และ 2 ตัว ตามลำดับ ช่วงเวลานี้มีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) ในตัวเต็มวัย โดยตัวเมียเต็มวัยสร้างไข่ (ovary) ในท่อรังไข่ (oviduct) และตัวผู้สร้างน้ำเชื้อ (sperm) ในถุงเก็บเชื้อ (spermatoza) เริ่มมีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic โดยพบว่า ตัวเมียบางตัวได้รับน้ำเชื้อจากตัวผู้ พิจารณาได้จากไข่ภายในท่อรังไข่ของตัวเมียมีการแบ่งตัว

และ/หรือพบตัวอ่อน J1 ลอกคราบภายในไข่ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ที่เกิดขึ้นภายในตัวแมลง โดยตัวผู้ 1 หรือมากกว่า 1 เข้าไปพันล้อมรอบตัวเมีย (ภาพที่ 5H) ซึ่งตัวเมียมีขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 3 เท่าของตัวผู้ โดยตัวเมียเฉลี่ยเท่ากับ 6,926 (5,332-8,332) ไมครอน (ภาพที่ 5G) และตัวผู้เฉลี่ยเท่ากับ 2,008 (1,784-2,260) ไมครอน (ภาพที่ 5F) ตัวผู้ทำการฉีดน้ำเชื้อผ่านทางอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spicule) สู่อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (vulva) เกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่และสเปอร์ม ช่วงเวลาของการผสมพันธุ์นี้เกิดขึ้นตั้งแต่ 48 ชม. เป็นต้นไป

ที่เวลา 72 ชม. ในช่วงเวลาตั้งแต่ 48 ถึง 72 ชม. เป็นช่วงของการเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยและการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย จึงไม่พบระยะ IJ และ J4 พบระยะตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ มีจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 40 และ 8 ตัว ตามลำดับ ในช่วงเวลานี้ไข่มีการผสม แบ่งเซลล์ และฟักเป็นตัวอ่อนระยะ J1 ภายในตัวแม่ ตัวแม่อุ้มท้องที่มีตัวอ่อนเบียดแน่นตลอดลำตัว ตัวแม่เริ่มเคลื่อนไหวช้าและตายในที่สุด และตัวแม่บางตัวพบว่ามี J1 เคลื่อนที่ออกจากตัวแม่ที่ตายแล้วโดยดันผนังลำตัวให้แตกออกทั้งทางส่วนหัวและหาง (ภาพที่ 5I) J1 มีขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 220 (208-236) ไมครอน (ภาพที่ 5B) พบ J1 เริ่มมีการเจริญเติบโตลอกคราบเป็นระยะ J2 มีขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 410 (388-434) ไมครอน (ภาพที่ 5C) ไส้เดือนฝอย J1 และ J2 จัดเป็นรุ่นลูกในชั่วที่ 1 (first generation) และจากการนับจำนวนไข่ของตัวเมีย 1 ตัว พบว่ามีจำนวนไข่ระหว่าง 850-1,120 ฟอง ดังนั้นตัวเมียของ *S. thailandense* n. sp. สามารถให้ลูกได้เฉลี่ยประมาณ 1,000 ตัวต่อตัวเมีย 1 ตัว

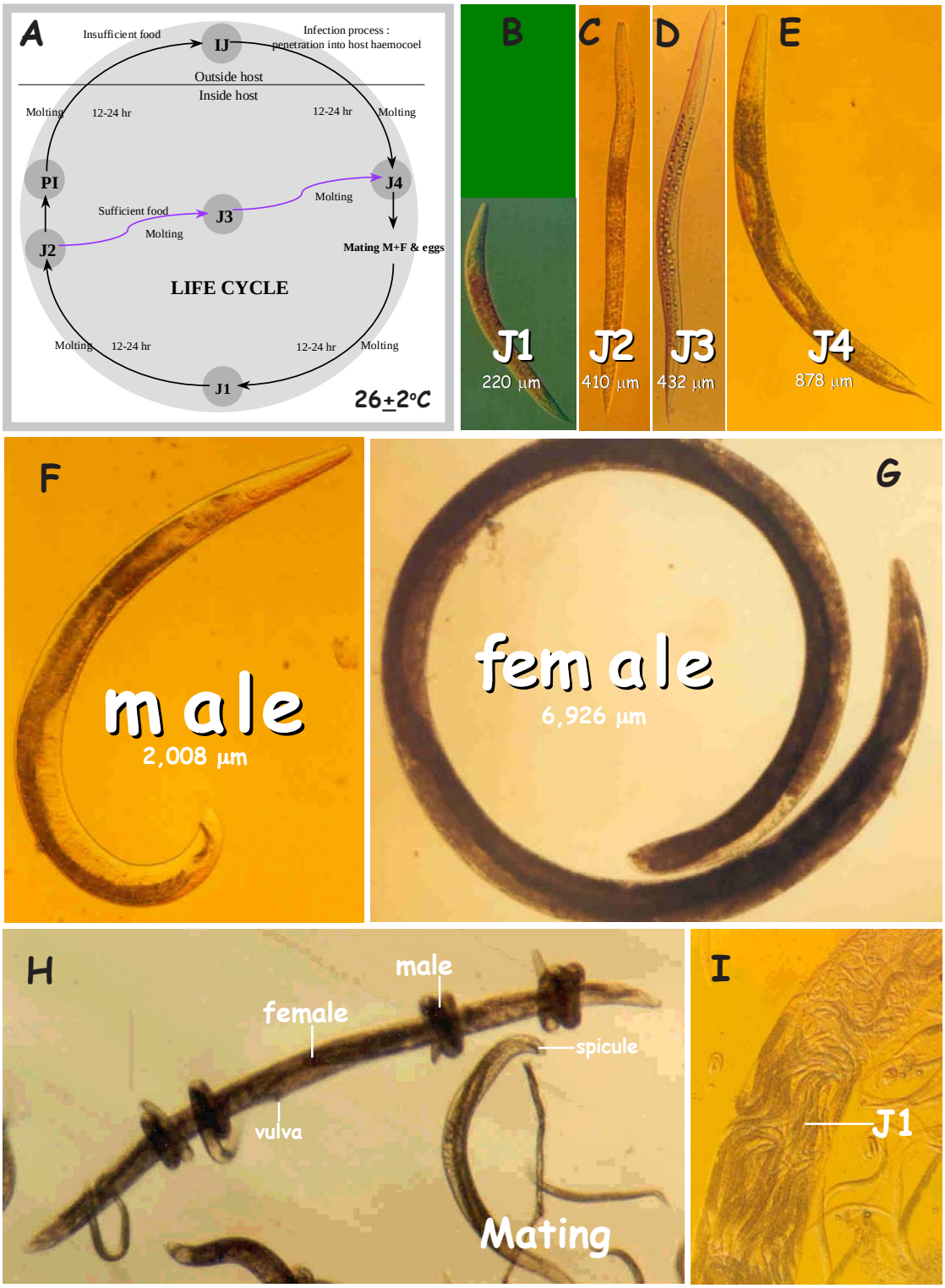
ที่เวลา 96 ชม. พบไส้เดือนฝอยระยะ J1 และ J2 เป็นจำนวนมากในตัวหนอนทดสอบ เฉลี่ยเท่ากับ 22,500 ตัว พบตัวเมียจำนวนเฉลี่ย 30 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่มีลูก J1 อยู่ในท้อง ตัวแม่บางส่วนตาย และ ณ เวลานี้ พบไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตจาก J2 เป็น J3 หรือ IJ จำนวนเฉลี่ย 1,240 ตัว ครบ 1 วงจรชีวิต โดยใช้เวลา 4 วัน

การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ภายในตัวหนอน (*G. mellonella*) ให้ข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาของสายพันธุ์ไทย และเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญต่อการพัฒนาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์พื้นเมืองนี้ไปใช้ประโยชน์ในอนาคต จากผลการศึกษาทำให้ได้ข้อมูลความสามารถในการเข้าสู่ตัวหนอนทดสอบ การลอกคราบของไส้เดือนฝอยเพื่อการเจริญเติบโต พฤติกรรมการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้-เพศเมีย การขยายพันธุ์และให้ลูกรุ่นใหม่ ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp. มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ จากรายงานการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* พบว่า ครบ 1 วงจรชีวิตในหนอน larch sawfly (*Cephalcia lariciphila*) ใช้เวลา 11 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °ซ (Georgis, 1981) และ *S. arenarium* มีวงจรชีวิตเร็วที่สุดในหนอน *G. mellonella* เท่ากับ 5 วัน ที่อุณหภูมิ 23 °ซ (Poinar and Kozodoi, 1988) จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า วงจรชีวิตของสายพันธุ์ไทยใกล้เคียงกับ *S. abbasi* ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากประเทศโอมาน มีวงจรชีวิตเท่ากับ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Elawad *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม วงจรชีวิตของ *Steinernema* spp. จะช้าหรือเร็วยังขึ้นกับชนิดของหนอนซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ภายในตัวหนอนของไส้เดือนฝอยในกลุ่ม steinernematid ซึ่งจากรายงานของ Nguyen and Smart

(1992) พบว่า *S. scapterisci* เฉพาะเจาะจงกับแมลงกะชอน (mole cricket, *Scapteriscus borelli*) ซึ่งเป็นแมลงในกลุ่ม Orthoptera (Gryllotalpidae) มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดี และวงจรชีวิตอยู่ระหว่าง 6-7 วัน ที่อุณหภูมิ 24 °ซ แต่ถ้าเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ในแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อ (Lepidoptera) พบว่า วงจรชีวิตใช้เวลา 10-11 วัน และการขยายพันธุ์ภายในตัวหนอนไม่ดี ตัวเมียให้ลูกได้น้อย ดังนั้น การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลง ยังมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ รวมทั้งตัวหนอนที่เฉพาะเจาะจง ซึ่ง Poinar (1979) รายงานว่า ไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด แต่ความรุนแรงในการเข้าทำลาย การเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ ยังคงขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยเป็นสำคัญ

การศึกษาวงจรชีวิตของ *S. thailandense* n. sp. สายพันธุ์ไทยชนิดใหม่นี้ ได้ทำการทดสอบในหนอน *G. mellonella* เพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นตัวหนอนที่นักวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั่วโลกยอมรับและนำมาใช้เป็นตัวหนอนทดสอบเบื้องต้น เนื่องจากเป็นแมลงในกลุ่มของหนอนผีเสื้อที่เป็นศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตร และยังสามารถเพาะเลี้ยงหนอนชนิดนี้ได้จากอาหารเทียม อย่างไรก็ตาม การนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนด้วงต่างๆ ปลวก แมลงกะชอน และแมลงสาบ ฯลฯ ควรทำการศึกษาวงจรชีวิตในแต่ละแมลงศัตรูพืช เพื่อได้ข้อมูลทางชีววิทยาที่จะเป็นประโยชน์ในการนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยไปใช้ให้ประสบผลสำเร็จกับแมลงเป้าหมายนั้นๆ

นอกจากนั้น ข้อมูลช่วงเวลาการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมียของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย ซึ่งอยู่ในช่วงตั้งแต่ 48-72 ชม. จะมีพฤติกรรมการจับคู่เพื่อผสมพันธุ์ องค์ความรู้เหล่านี้สำคัญต่อกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารเหลวระดับถังหมัก (fermenter) ที่ต้องมีการกวนอาหารด้วยใบพัดเพื่อให้ออกซิเจนหมุนเวียนภายในถังหมัก ใบพัดจะมีผลกระทบต่อขบวนการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ส่งผลถึงผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ ดังนั้น ในช่วงเวลาของการจับคู่ผสมพันธุ์ จึงควรปรับจังหวะการกวนของใบพัดให้เหมาะสม ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในเชิงการค้าต่อไป



J1 = first-stage juvenile ; J2 = second-stage juvenile ; PI = preinfective-stage juvenile ; J3 = third-stage juvenile ; IJ = infective-stage juvenile ; J4 = fourth-stage juvenile ; M = male ; F = female

ภาพที่ 5 วงจรชีวิต (A) และการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. แบ่งเป็นตัวอ่อน 4 ระยะ และตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย (B-G) พฤติกรรมการผสมพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (H) และตัวแม่ให้ลูกรุ่นแรกภายในลำตัว (I)

3.1.2 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการขยายพันธุ์

จากการศึกษาพบว่า ระดับของอุณหภูมิมีผลต่อวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกัน ทั้งในด้านการเจริญเติบโตและจำนวนวันของวงจรชีวิต พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตในแต่ละระดับของอุณหภูมิเมื่อมีการผ่าหนอนทดสอบทุกๆ 24 ชม. (ตารางที่ 3) โดยพบว่าอุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 15°ซ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเจริญเติบโตได้เพียง J4 ระยะเดียวเท่านั้น และหยุดการพัฒนา ส่วนในสายพันธุ์ต่างประเทศยังสามารถพัฒนาได้ถึงตัวเต็มวัยแต่ค่อนข้างช้าใช้เวลาถึง 144 ชม. และที่อุณหภูมิสูง 38°ซ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเจริญเติบโตได้ถึงตัวเต็มวัยแต่ไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ ส่วนสายพันธุ์ต่างประเทศไม่สามารถเจริญเติบโตและตายภายในตัวหนอนทดสอบเมื่ออุณหภูมิสูงตั้งแต่ 35°ซ ขึ้นไป ดังนั้น ช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขยายพันธุ์ของสายพันธุ์ไทยอยู่ระหว่าง 20-35 °ซ และเหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 30 °ซ มีวงจรชีวิตสั้นที่สุด 4 วัน (96 ชม.) ในสายพันธุ์ต่างประเทศอยู่ระหว่าง 20-30 °ซ และเหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 25 °ซ มีวงจรชีวิตสั้นที่สุด 5 วัน (120 ชม.) รายละเอียดในแต่ละระดับอุณหภูมิ อธิบายได้ดังนี้ :-

ที่อุณหภูมิ 15 °ซ หลังการใส่ไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์ ตั้งแต่ 0-48 ชม. พบว่า หนอนทดสอบที่ถูกเข้าทำลายยังคงมีชีวิต เมื่อผ่าหนอนที่เวลา 24 ชม. พบเฉพาะระยะ IJ ของทั้งสองสายพันธุ์อยู่ภายในตัวหนอน ไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์เริ่มมีการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะ J4 ตั้งแต่เวลา 48 ชม. เป็นต้นไป พบว่าสายพันธุ์ต่างประเทศเจริญเติบโตได้ดีกว่าสายพันธุ์ไทย โดยมีเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตในสายพันธุ์ต่างประเทศเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไทยเท่ากับ 80.0 และ 36.7 % เมื่อเวลาผ่านไป 144 ชม. ตามลำดับ และสายพันธุ์ต่างประเทศยังสามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้เท่ากับ 2.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่พบตัวเต็มวัยในสายพันธุ์ไทยที่เวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตาม ทั้งสองสายพันธุ์ยังคงมีชีวิตอยู่ภายในตัวหนอนทั้งระยะ IJ และ J4 เมื่อทำการผ่าทุกๆ 24 ชม. เป็นเวลา 6 วัน

ที่อุณหภูมิ 20 °ซ ผ่าหนอนทดสอบที่เวลา 24 ชม. พบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยจากระยะ IJ เป็น J4 และเริ่มเป็นตัวเต็มวัยตั้งแต่ 48 ชม. เป็นต้นไป ของทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโต พบว่า สายพันธุ์ต่างประเทศมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสายพันธุ์ไทย ซึ่งพบว่าที่เวลา 120 ชม. สายพันธุ์ต่างประเทศเจริญเป็นตัวเต็มวัยเท่ากับ 96.6 % เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเท่ากับ 76.8 % ตลอดจนการให้ลูก J1 และ J2 ของสายพันธุ์ต่างประเทศ มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าสายพันธุ์ไทย เมื่อตรวจนับที่เวลา 144 ชม.

ที่อุณหภูมิ 25 °ซ พบว่าหนอนทดสอบตายครบ 100 % ที่เวลา 30 ชม. ในสายพันธุ์ต่างประเทศ และ 26 ชม. ในสายพันธุ์ไทย ไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตได้ดี และสามารถให้ลูก J1 ได้ตั้งแต่เวลา 120 ชม. เป็นต้นไป และทั้งสองสายพันธุ์ครบวงจรชีวิต 1 รอบ จาก IJ ถึง IJ ใช้เวลา 5 วัน และยังพบว่าในสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเป็นตัวเต็มวัยรุ่นที่ 2 เท่ากับ 1.7 % เมื่อผ่าหนอนทดสอบที่เวลา 144 ชม.

ที่อุณหภูมิ 30 °ซ พบการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในสายพันธุ์ไทย โดยพบลูก J1 และ J2 เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 72 ชม. และครบวงจรชีวิตจาก IJ ถึง IJ ใช้เวลาเพียง 4 วัน รวมทั้งพบตัวเต็มวัยรุ่นที่ 2 เท่ากับ 2.9 % ที่เวลา 144 ชม. แต่ยังไม่พบตัวเต็มวัยรุ่นที่ 2 ในสายพันธุ์ต่างประเทศที่เวลาเท่ากัน

ที่อุณหภูมิ 35 °ซ พบว่า หนอนทดสอบที่ใส่ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศยังคงมีชีวิต เมื่อนำหนอนมาผ่าที่เวลา 24 และ 48 ชม. ไม่มีการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยและพบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายต่ำ เมื่อผ่าที่เวลา 72 ชม. ไม่พบไส้เดือนฝอยภายในตัวหนอน แสดงว่าไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศตาย เนื่องจากผลของอุณหภูมิที่สูง ส่วนในสายพันธุ์ไทยสามารถฆ่าหนอนทดสอบตายได้ตั้งแต่เวลา 12 ชม. และตายครบ 100 % ที่เวลา 24 ชม. มีการเจริญเติบโตภายในตัวหนอนได้ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 °ซ

ที่อุณหภูมิ 38 °ซ จากการผ่าหนอนทดสอบที่ใส่สายพันธุ์ต่างประเทศพบว่า ไม่มีไส้เดือนฝอย IJ ภายในตัวหนอน แสดงว่า ไส้เดือนฝอยไม่มีความสามารถในการเข้าทำลายหนอนเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงทำให้ไส้เดือนฝอยอ่อนแอและ/หรือตาย ส่วนในสายพันธุ์ไทยพบการเข้าทำลายและทำให้หนอนทดสอบตายจำนวน 2 ใน 5 ตัวหรือเท่ากับ 40 % มีการเจริญเติบโตภายในหนอนทดสอบถึงระยะตัวเต็มวัยเท่านั้นเมื่อตรวจนับที่เวลา 144 ชม. ไส้เดือนฝอยมีลักษณะอ่อนแอและไม่พบการสร้างรังไข่ในตัวเมีย และไม่พบตัวผู้

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ไทยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 35 °ซ สายพันธุ์ต่างประเทศไม่สามารถอยู่รอดได้ แต่ในสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 30 °ซ และที่อุณหภูมิสูงถึง 38 °ซ สายพันธุ์ไทยก็ยังพัฒนาได้ถึงตัวเต็มวัยและยังคงศักยภาพในการฆ่าแมลงทดสอบได้ในระดับหนึ่ง (40 %) งานวิจัยนี้สนับสนุนวิทยานิพนธ์ของ Tangchitsomkid (2000) ในการทดสอบความทนร้อน (heat tolerance) ของ *S.thailandense* n. sp. เปรียบเทียบกับ *S. carpocapsae* พบว่า ที่อุณหภูมิ 38 °ซ หนอนทดสอบที่ถูกเข้าทำลายโดย *S. thailandense* n. sp. เริ่มมีการตายที่เวลา 30 ชม. แต่ไม่ครบ 100 % เมื่อตรวจนับถึง 48 ชม. และ *S. carpocapsae* ไม่มีศักยภาพในการทำให้หนอนทดสอบตายได้ที่อุณหภูมิเดียวกัน

ไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย มีคุณสมบัติของความทนร้อนเช่นเดียวกับ *S. riobrave* ที่แยกได้จากดินในรัฐเท็กซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา (Cabanillas *et al.*, 1994) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาและผลิตสายพันธุ์เท็กซัสในระดับการค้า และเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในอเมริกาโดยบริษัท Biosys (Georgies, 1992) คุณสมบัติของการทนทานอุณหภูมิได้สูง มีข้อดีหลายประการคือ สามารถเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอุณหภูมิห้องปกติ รวมถึงการเก็บรักษาและการขนส่งผลิตภัณฑ์ ไม่จำเป็นต้องใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิเช่นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเขตอบอุ่น-หนาว ได้แก่ *S. carpocapsae* *S. kushidai* และ *S. scapterisci* ส่งผลให้ลดต้นทุนการผลิตลดลง ตลอดจนการนำไปใช้ในสภาพไร่-นา โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิสูง (30-35 °ซ) โอกาสประสบผลสำเร็จย่อมสูงกว่า ข้อดีต่างๆ เหล่านี้ จึงควรได้มีการพัฒนา *S. thailandense* n. sp. สายพันธุ์ไทย ให้นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่มีความหลากหลายในแปลงเกษตรกรของไทยต่อไป

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศ (*Steinernema carpocapsae* All strain) และสายพันธุ์ไทย (*S. thailandense* n. sp. Thai strain) ที่ความแตกต่างของแต่ละระดับอุณหภูมิ 15 20 25 30 35 และ 38 องศาเซลเซียส ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 วัน

ที่เวลา (ชม.)	ระยะของไส้เดือนฝอย	เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ของแต่ละสายพันธุ์											
		15°ซ		20°ซ		25°ซ		30°ซ		35°ซ		38°ซ	
		All	Thai	All	Thai	All	Thai	All	Thai	All	Thai	All	Thai
24	IJ	100	100	90.5	84.2	22.4	47.5	41.9	18.8	100	62.1	0	100
	J4	0	0	9.5	15.8	77.6	52.5	51.5	76.9	0	35.3	0	0
	Adult (G1)	0	0	0	0	0	0	6.6	4.3	0	2.6	0	0
48	IJ	64.7	96.4	21.6	0	0	0	13.9	9.9	100	21.7	0	42.8
	J4	35.3	3.6	56.8	85.8	20.3	11.1	47.2	23.2	0	0	0	28.6
	Adult (G1)	0	0	21.6	14.2	79.7	88.9	38.9	66.9	0	78.3	0	28.6
72	IJ	48.9	80.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7
	J4	51.1	20.0	6.8	53.6	0	17.7	0	0	0	0	0	60.3
	Adult (G1)	0	0	93.2	46.4	100	82.3	100	78.8	0	100	0	23.0
	J1, J2	0	0	0	0	0	0	0	21.2	0	0	0	0
96	IJ	32.4	72.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22.8
	J4	67.6	27.8	3.6	27.0	0	6.7	0	0	0	0	0	58.6
	Adult (G1)	0	0	96.4	73.0	100	93.3	100	5.2	0	40.0	0	18.6
	J1, J2	0	0	0	0	0	0	0	93.0	0	50.7	0	0
	J3	0	0	0	0	0	0	0	1.8	0	9.3	0	0
120	IJ	43.0	66.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34.6
	J4	57.0	33.3	3.4	23.2	38.4	11.0	0	0	0	0	0	38.9
	Adult (G1)	0	0	96.6	76.8	53.8	85.4	12.0	2.0	0	30.8	0	26.5
	J1, J2	0	0	0	0	6.2	2.4	88.0	88.2	0	42.3	0	0
	J3	0	0	0	0	1.6	1.2	0	5.8	0	7.7	0	0
	J4	0	0	0	0	0	0	0	4.0	0	19.2	0	0
144	IJ	17.3	63.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20.0
	J4	80.0	36.7	0	17.4	1.2	12.3	0	0	0	0	0	45.7
	Adult (G1)	2.7	0	50.0	52.2	85.1	13.4	10.7	0	0	30.9	0	34.3
	J1, J2	0	0	25.0	17.4	1.1	60.0	80.1	72.6	0	55.6	0	0
	J3	0	0	25.0	13.0	12.6	12.6	7.0	20.0	0	10.3	0	0
	J4	0	0	0	0	0	0	2.2	4.5	0	2.2	0	0
	Adult (G2)	0	0	0	0	0	1.7	0	2.9	0	1.0	0	0

หมายเหตุ : All = สายพันธุ์ต่างประเทศ ; Thai = สายพันธุ์ไทย ; J1, J2, J3 และ J4 = ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 1 2 3 และ 4 ; IJ = ไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย ; Adult (G1) และ Adult (G2) = ตัวเต็มวัยชั่วที่ 1 และตัวเต็มวัยชั่วที่ 2

3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อการผลิตโดยใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธี

3.2.1 Quadrant plate bioassay

จากผลการทดลองไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*S. thailandense* n. sp.) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้า (*S. carpocapsae*) จำนวนชนิดละ 100 ตัว หยดที่ตำแหน่งจุดศูนย์กลางของ quadrant agar plate พบว่า ไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์เคลื่อนที่ออกจากจุดศูนย์กลางได้ในทุกทิศทาง โดยในทิศทางที่มีหนอนเหยื่อล่อ (T1-3) สายพันธุ์ไทยเคลื่อนที่เท่ากับ 18.6 15.8 และ 2.4 ตัว และทิศทางตรงข้าม (B1-3) เท่ากับ 11.8 13.8 และ 2.0 ตัว นับจำนวนที่เวลา 10 20 และ 30 นาที ตามลำดับ มีผลรวมของ T1-3 และ B1-3 เท่ากับ 64.4 ตัว ซึ่งแตกต่างกันเล็กน้อยกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่มีการเคลื่อนที่ในทิศทาง T1-3 เท่ากับ 15.8 13.6 และ 2.2 ตัว และทิศทาง B1-3 เท่ากับ 12.6 11.4 และ 1.2 นับจำนวนที่เวลาเดียวกัน ผลรวมเท่ากับ 56.8 ตัว เมื่อนำไปคำนวณค่าระยะทางเฉลี่ย ($\bar{\chi}$) ของการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ (T1-3) คูณด้วยระยะเวลาที่กำหนด (10 20 และ 30 นาที) ของไส้เดือนฝอยแต่ละสายพันธุ์ หักลบจากค่าการเคลื่อนที่ในทิศทางตรงข้าม (B1-3) ของไส้เดือนฝอยที่เวลาเดียวกัน ตามสูตรของ Campbell พบว่า ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยมีศักยภาพในการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อได้ดีกว่าใน 10 นาทีแรก และลดลงที่เวลา 20 และ 30 นาที (ภาพที่ 6) แต่เมื่อพิจารณาผลรวมของค่า $\bar{\chi}$ ภายในเวลา 30 นาที พบว่า สายพันธุ์ไทยมีค่า $\bar{\chi}$ เท่ากับ 1.20 และสายพันธุ์ต่างประเทศเท่ากับ 1.06 ซึ่งสายพันธุ์ไทยสูงกว่าเท่ากับ 0.14

3.2.2 Migration in sand column bioassay

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ในแนวดิ่ง ระยะทาง 5 ซม. เข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศพบว่า ไส้เดือนฝอยทั้งสองชนิด สามารถเคลื่อนตัวจากผิวดินเข้าทำลายหนอนที่อยู่ห่างเป็นระยะทาง 5 ซม. ในแนวดิ่ง และทำให้หนอนตาย 100 % ทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อทำการผ่าซากหนอนหลังไส้เดือนฝอยเข้าทำลายเป็นเวลา 5 วัน ตรวจพบไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเข้าไปเจริญเติบโตแพร่ขยายปริมาณในตัวหนอน โดยพบตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียมีการผสมพันธุ์วางไข่และให้ลูกรุ่นแรก ส่วนในสายพันธุ์ต่างประเทศทำการผ่าซากหนอนตรวจภายในระยะเวลาเท่ากันพบว่า เริ่มมีการลอกคราบจากระยะ IJ เป็นตัวอ่อนระยะที่ 4 เท่านั้น ยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัย แสดงว่าสายพันธุ์ไทยเคลื่อนที่เข้าหาหนอนและเข้าทำลายได้รวดเร็วกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ รวมทั้งมีการเจริญเติบโตขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วเมื่อเข้าไปภายในตัวหนอนทดสอบ

3.2.3 Nematode tolerance bioassays

3.2.3.1 Heat tolerance

จากการทดสอบพ่นไส้เดือนฝอยสองสายพันธุ์บนผิวหน้าดินทราย นำไปวางที่อุณหภูมิระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชม. และนำมาทดสอบศักยภาพในการฆ่าหนอนกินรังผึ้งที่เป็นเหยื่อล่อ พบว่า ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ มีความทนทานต่ออุณหภูมิระดับต่างๆ แตกต่างกัน โดยพิจารณาเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเหยื่อ ซึ่งในสายพันธุ์ไทยมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ สามารถฆ่าหนอนได้ 97-100 % เมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-35 °ซ และวางที่อุณหภูมิสูงถึง 40 °ซ ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยยังคงศักยภาพในการเข้าทำลายและฆ่าหนอนเหยื่อได้ 43 % แต่เมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 15 °ซ สามารถฆ่าหนอนได้เพียง 17 % ตรงข้ามกับสายพันธุ์ต่างประเทศทนทานต่ออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง โดยพบว่าไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายของสายพันธุ์ต่างประเทศมีศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบได้ 77 และ 93 % ที่อุณหภูมิ 15 และ 20 °ซ ตามลำดับ แต่ไม่ทนทานและลดศักยภาพในการฆ่าหนอนเมื่อนำไปวางที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35 °ซ เท่ากับ 27 % และไม่สามารถฆ่าหนอนได้เมื่อวางที่อุณหภูมิ 40 °ซ ระดับอุณหภูมิที่ดีที่สุดและไม่ทำให้ศักยภาพของไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์ลดลงคือที่อุณหภูมิ 25-30 °ซ สามารถฆ่าหนอนกินรังผึ้งตายได้ 90-100 % (ภาพที่ 7)

3.2.3.2 Exposure to sunlight

อิทธิพลของแสงแดดในช่วงเวลาต่างๆ มีผลต่อความทนทานและศักยภาพในการฆ่าแมลงของไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์ ในช่วงเวลา 6.00-7.00 นาฬิกา แสงแดดไม่ทำลายหรือฆ่าไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์ และในสายพันธุ์ไทยมีความทนทานแสงแดด ได้จนถึง 10.00 นาฬิกา โดยยังคงศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบตายได้ 90-100 % ส่วนในสายพันธุ์ต่างประเทศในช่วงเวลาตั้งแต่ 6.00-10.00 นาฬิกา สามารถฆ่าหนอนได้ 83-100 % สำหรับในช่วงเวลา 16.00-18.00 น. ไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์มีศักยภาพในการฆ่าลดลง เนื่องจากแสงแดดในช่วงเย็นและระดับของอุณหภูมิยังคงสูง ทำให้ไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์อ่อนแอ ความสามารถในการ ฆ่าหนอนลดลงเท่ากับ 43-50 % (ภาพที่ 8)

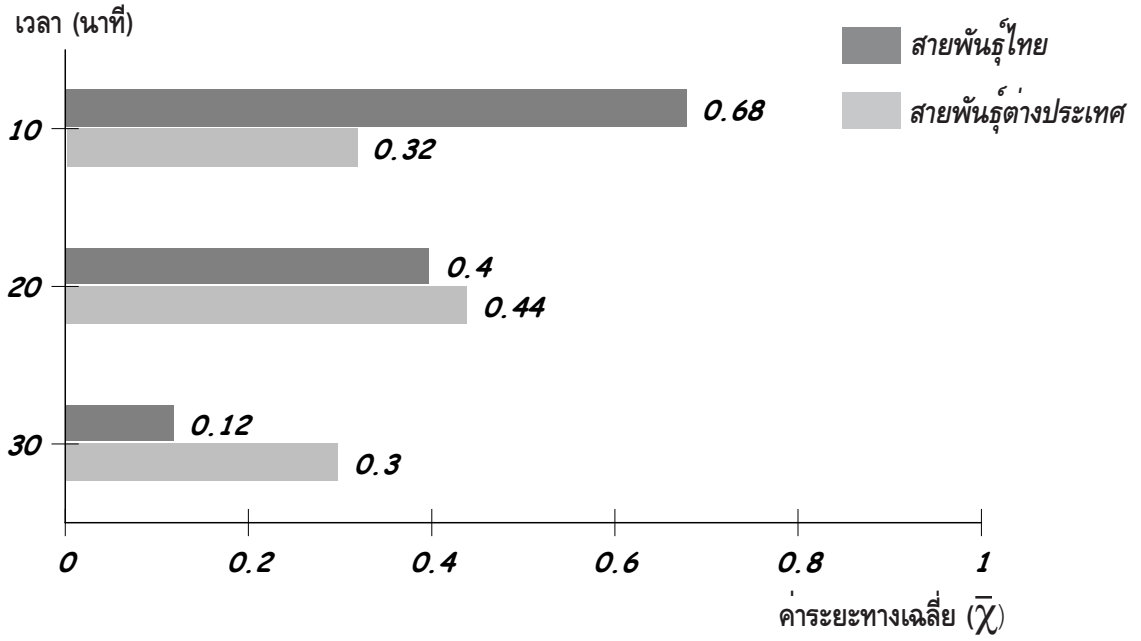
S. thailandense n. sp. สายพันธุ์ไทยเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิดใหม่ที่ค้นพบในเขตพื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย ซึ่งเป็นเขตร้อนชื้น มีสภาพอุณหภูมิเฉลี่ย 35-37 °ซ จากการศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอยพบว่าเป็นสายพันธุ์ทนร้อน (heat tolerance isolate) สามารถฆ่าแมลงได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 °ซ (Tangchitsomkid, 2000) อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติทนร้อนนี้เป็นเพียงข้อดีในเบื้องต้นของการพิจารณาคัดเลือกมาขยายปริมาณในอาหารเทียม (articifial media) และนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการ ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้า (*S. carpocapsae)* จึงเป็นวิธีการคัดเลือกที่สามารถบ่งบอกศักยภาพของสายพันธุ์เทียบได้กับสายพันธุ์อื่น ซึ่งในสกุล *Steinernema* spp. ปัจจุบันจำแนกได้ 25 ชนิด มีเพียง 6-7 ชนิดเท่านั้นที่ถูกคัดเลือกมาผลิตเป็นการค้า (นุชนารถและคณะ, 2543)

จากการทดสอบการค้นหาแมลงเหยื่อของไส้เดือนฝอย โดยใช้เทคนิค quadrant plate bioassay ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเคลื่อนที่ในทิศทางเข้าหาหนอนเหยื่อล่อได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ต่างประเทศ แสดงว่าไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายของสายพันธุ์ไทย มีความแข็งแรงในการเคลื่อนตัวไปในทิศทางที่ต้องการได้เช่นเดียวกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้า

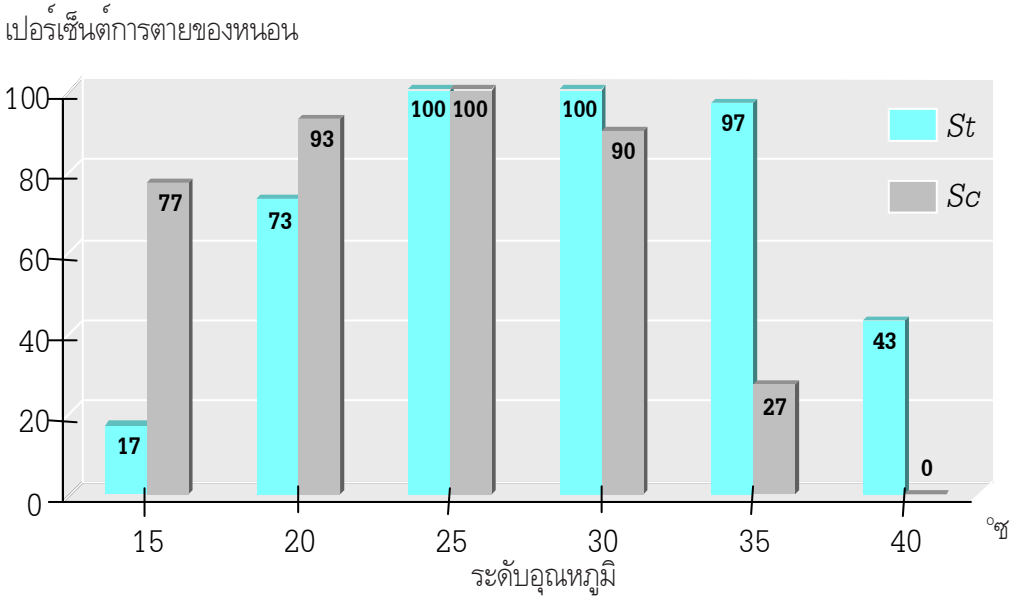
การทดสอบการเคลื่อนที่ในแนวดิ่ง โดยใช้เทคนิค migration in sand column bioassay เป็นการวิเคราะห์ศักยภาพของสายพันธุ์เพื่อการคัดเลือกอีกวิธีหนึ่ง ที่สามารถแสดงให้เห็นการเคลื่อนตัวของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในแนวดิ่งระยะทาง 5 ซม. เข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อ เท่ากับ 100 % เช่นเดียวกับสายพันธุ์ต่างประเทศ ที่ผลิตเป็นการค้า การค้นหาเหยื่อหรือแมลงที่เป็นแหล่งอาหาร (host-finding) เป็นพฤติกรรมของไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน เช่น ไส้เดือนฝอย *S. scapterisci* มีพฤติกรรมการหยุดนิ่งและรอแมลงเหยื่อเข้ามาหา โดยไส้เดือนฝอยชนิดนี้ใช้ควบคุมแมลงกะชอนในสนามกอล์ฟได้ดี เนื่องจากแมลงกะชอนมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วบนผิวดิน (Campbell and Gaugler, 1993) การใช้ migration in sand column bioassay วิเคราะห์และตรวจสอบสายพันธุ์ไทย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีพฤติกรรมการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อเช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ที่ผลิตเป็นการค้า แต่อย่างไรก็ตามเมื่อผ่าซากหนอนที่ถูกเข้าทำลาย ยังพบว่าสายพันธุ์ไทยเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อได้เร็วกว่า สามารถพบการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยภายในซากหนอนได้เร็วกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ รวมทั้งอุณหภูมิที่ทำการทดลอง (25+2°ซ) เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ในตัวหนอนของสายพันธุ์ไทยได้ดีกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ

จากการทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิหรือ heat tolerance แสดงให้เห็นชัดเจนถึงความทนทานต่ออุณหภูมิสูงของสายพันธุ์ไทย จึงจัดเป็นสายพันธุ์ทนร้อนเช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่แยกได้จากรัฐเท็กซัส สหรัฐอเมริกา (Cabanillas *et al.*, 1994) และ *S. abbasi* จากประเทศโอมาน (Elawad *et al.*, 1997) แต่ไม่ทนทานหรือศักยภาพในการทำลายลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง (15-20 °ซ) การทดสอบนี้ตรงกับรายงานของ Tangchitsomkid (2000) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเข้าทำลายแมลงอยู่ระหว่าง 25 ถึง 35 °ซ

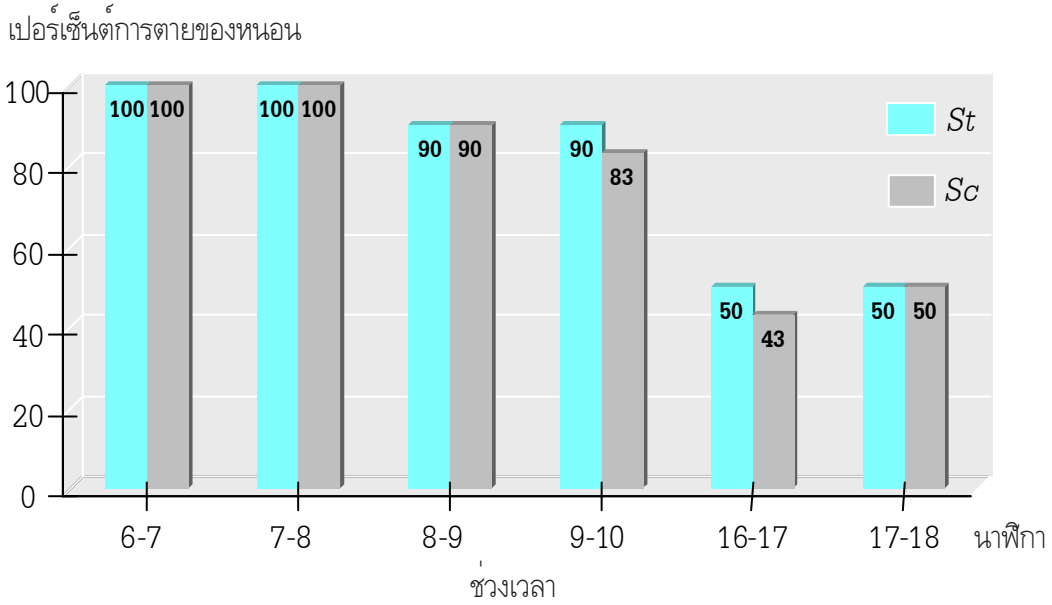
อิทธิพลของแสงแดดมีผลต่อไส้เดือนฝอย รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อื่นๆ เช่น แบคทีเรียบีทีหรือไวรัสเอ็นพีวี จากการทดสอบวางไส้เดือนฝอยทั้งสองชนิดที่ช่วงเวลาเช้า (6.00-10.00 นาฬิกา) และช่วงเย็น (16.00-18.00 นาฬิกา) ผลการทดสอบพบว่าสายพันธุ์ไทยมีความทนทานไม่ต่างจากสายพันธุ์ต่างประเทศ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวเป็นข้อมูลเบื้องต้นของการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลง และการใช้ในช่วงเช้า (6.00-7.00 นาฬิกา) จะดีกว่าการใช้ในช่วงเย็น โดยเฉพาะการใช้ไส้เดือนฝอยทางดิน เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ในฤดูร้อนมีแดดจัดและอุณหภูมิในช่วงกลางวันสูงเฉลี่ยถึง 35+2 °ซ จนถึงช่วงเย็นดินยังสะสมความร้อนและมีช่วงกลางวันยาว ดังนั้น การใช้ไส้เดือนฝอยให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ควรพิจารณาถึงฤดูกาลและระดับของอุณหภูมิในแปลงปลูก การใช้ไส้เดือนฝอยในฤดูร้อน จึงควรใช้ในช่วงเช้าจึงจะประสบผลสำเร็จสูงกว่าในช่วงเย็น



ภาพที่ 6 ค่าระยะทางเฉลี่ย ($\bar{\chi}$) ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema thailandense* n. sp.) และสายพันธุ์ต่างประเทศ (*S. carpocapsae*) เข้าหาหนอนเหยื่อล่อที่เวลา 10 20 และ 30 นาที (คำนวณจากสูตรของ Campbell, 1994)



ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเหยื่อล่อ (*Galleria mellonella*) ที่ถูกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema thailandense* n. sp., *St*) และสายพันธุ์ต่างประเทศ (*S. carpocapsae, Sc*) เข้าทำลาย หลังจากการวางไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์เพื่อทดสอบความทนทานและศักยภาพที่อุณหภูมิระดับต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเหยื่อล่อ (*Galleria mellonella*) ที่ถูกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema thailandense* n. sp., *St*) และสายพันธุ์ต่างประเทศ (*S. carpocapsae, Sc*) เข้าทำลาย หลังจากการวางไส้เดือนฝอยทั้งสองสายพันธุ์เพื่อทดสอบความทนทานและศักยภาพที่ช่วงเวลาต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

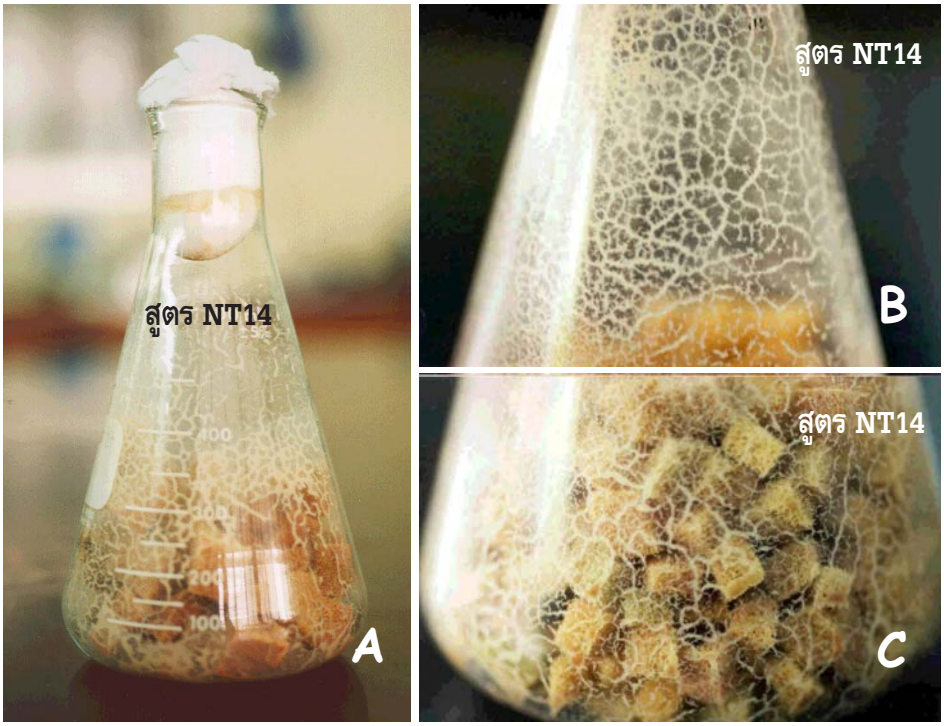
4. การขยายปริมาณไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *S. thailandense* n. sp. ในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว

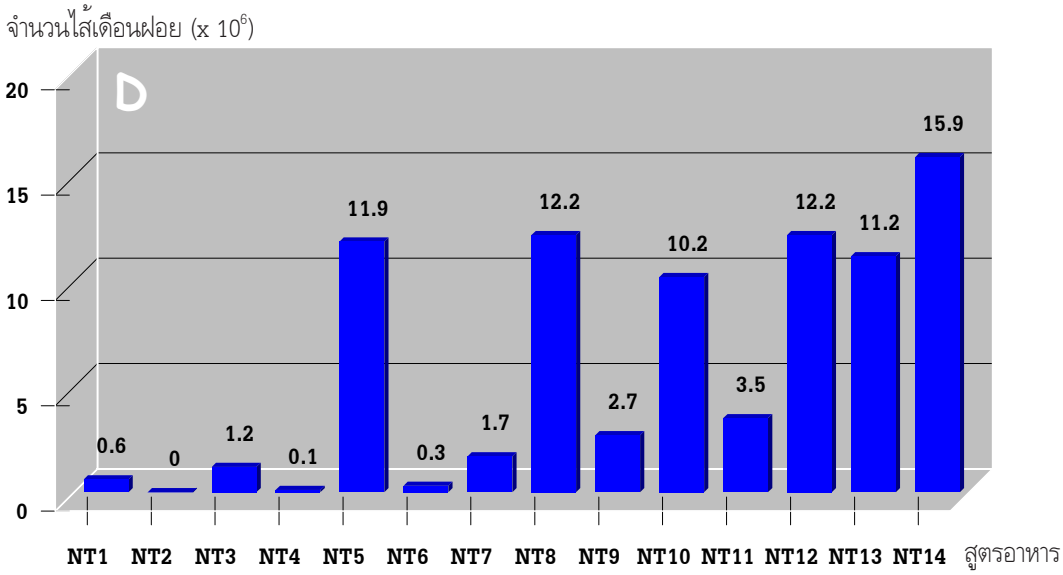
4.1 การศึกษาสูตรอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว

จากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ monoxenic culture จำนวน 14 สูตร ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ในช่วงของการเพาะเลี้ยงวันที่ 6-7 วัน ไส้เดือนฝอยระยะเก็บเกี่ยว (IJ) เคลื่อนที่ขึ้นมาแผ่กระจายเป็นเส้นตาข่ายจำนวนมากบริเวณรอบขวดเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 9 A-C) จากผลการตรวจนับจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้พบว่า สูตรอาหาร NT14 ที่มีองค์ประกอบของไตหมู 50 % ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 15.9 ล้านตัวต่ออาหาร 25 กรัม สูตรอาหารที่ให้ผลผลิตเฉลี่ยระหว่าง 10-12 ล้านตัว เรียงตามลำดับผลผลิตที่ได้ คือ สูตร NT13 NT8 NT5 NT12 และ NT10 เท่ากับ 12.2 12.2 11.9 10.5 และ 10.2 ล้านตัว ที่มีองค์ประกอบของไตหมู 25 % นมถั่วเหลือง (ไวตามิ้ลค์) 90 % อาหารสุนัข 25 % ไส้ไก่ 50 % และหัวใจไก่ 50 % ตามลำดับ ส่วนในอาหารสูตรอื่นๆ ให้ผลผลิตต่ำอยู่ระหว่าง 0-3.5 ล้านตัว (ภาพที่ 9D)

เมื่อพิจารณาจากผลผลิตไส้เดือนฝอยในแต่ละสูตรอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของสูตรอาหารและอัตราส่วนผสม (%) มีผลต่อผลผลิตของไส้เดือนฝอย โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NT13 และ NT14 ซึ่งมีไตหมูสูตร 25 และ 50 % เป็นส่วนผสมหลัก ให้ผลผลิตสูงขึ้นตามอัตราส่วนผสมเท่ากับ 12.2 และ 15.9 ล้านตัว ตามลำดับ ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เพิ่มขึ้น จึงขึ้นกับความเหมาะสมของปริมาณและคุณค่าจากสารอาหารที่ได้รับ มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและขบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dunphy and Webster (1989) ซึ่งทำการศึกษาองค์ประกอบของอาหาร (nutritional components) ในการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย พบว่า ผลผลิตไส้เดือนฝอยขึ้นกับสารอาหารต่างๆ ที่เหมาะสม โดยองค์ประกอบของอาหารในการเพาะเลี้ยง *S. carpocapsae* DD 136 ได้จากแหล่งไนโตรเจน (15 % Tryptic soy broth และ 5 % yeast extract) แหล่งคาร์บอน (14 % D-glucose) และ lipid (1 % sunflower oil) อย่างไรก็ตาม สารอาหารชนิดต่างๆ ยังมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกันด้วย โดย culture ที่มี stearic acid จากน้ำมันดอกทานตะวัน เพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และน้ำมันตับปลา เพิ่มผลผลิตให้กับ *H. heliothidis*

สำหรับในสูตรอาหาร NT8 เตรียมจากนมถั่วเหลืองไวตามิ้ลค์ และน้ำมันหมู ในอัตราส่วน 90 : 10 ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยในระดับเดียวกับสูตร NT13 โดยนมถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยเช่นเดียวกับไตหมู ไส้ไก่ หัวใจไก่ และอาหารสุนัขสำเร็จรูป ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากสูตรอาหาร NT8 นี้ สอดคล้องกับรายงานของ Tangchitsomkid (2000) ได้ทดสอบเพาะเลี้ยง *S. thailandense* n. sp. ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. โดยใช้อาหารเทียมชนิดวุ้น 5 สูตร พบว่าสูตรที่มีองค์ประกอบของนมถั่วเหลือง ให้ผลผลิตสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 661,400 ตัวต่ออาหาร 20 กรัม





ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandense* n. sp. ในอาหารแข็งกึ่งเหลว สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เป็นเวลา 7 วัน

A, B และ C) ไส้เดือนฝอยระยะเก็บเกี่ยว (IJ) เคลื่อนที่ขึ้นมาแผ่กระจายเป็นเส้นตาข่ายรอบขวดเพาะเลี้ยง

D) ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลว 14 สูตร

การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *S. thailandense* n. sp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไทยชนิดใหม่นั้น มีพื้นฐานและเทคนิคจาก Bedding (1981) ซึ่งเป็นผู้ที่พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลวในสภาพ monoxenic culture เป็นผลสำเร็จและเทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง โดยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ประกอบด้วยไตหมู 60 % ไขมันสัตว์ 20 % และน้ำ 20 % ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 570 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบผลผลิตกับการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ไทยในอาหาร 1 ลิตร ของสูตร NT14 ให้ผลผลิตเท่ากับ 636 ล้านตัว อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสูตรอาหารยังต้องคำนึงถึงต้นทุนองค์ประกอบของอาหารที่มีราคาถูก หาได้ง่าย การเตรียมไม่ยุ่งยาก รวมทั้งต้นทุนแรงงานเป็นสำคัญ เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ไทยและขยายผลไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ในอนาคต

จากผลของงานวิจัยนี้ได้สูตรอาหารที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงและราคาถูก รวม 3 สูตร คือ สูตรไตหมู (NT14) สูตรนมถั่วเหลืองไวตามิ้ลค์ (NT8) และสูตรอาหารสุนัขสำเร็จรูป (NT5) ซึ่งมีต้นทุนอาหารต่อ 1 ลิตร เท่ากับ 60 26 และ 21 บาท ให้ผลผลิตเฉลี่ย 636 488 และ 476 ล้านตัว ตามลำดับ และเมื่อนำไปคิดคำนวณและเปรียบเทียบต้นทุนการผลิต *S. carpocapsae* ในอาหารแข็งกึ่งเหลวและสภาพการเลี้ยงแบบเดียวกัน กับรายงานของวัชรี และคณะ (2542) โดยพิจารณาต้นทุนราคาอาหาร ค่าแรงงาน ค่าเสื่อมราคา และผลผลิตที่ได้เป็นผลิตภัณฑ์บรรจุซอง ในเวลา 1 เดือน พบว่าต้นทุนการผลิต *S. carpocapsae* เท่ากับ 19.8 บาทต่อ 1 ซอง (4 ล้านตัว) ในเวลา 1 เดือน ผลิตได้ 1,920 ซอง (7,680 ล้านตัว) ส่วนไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร NT14 มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 4.38 บาทต่อ 1 ซอง (4 ล้านตัว) ในเวลา 1 เดือน ผลิตได้ 6,360 ซอง (25,440 ล้านตัว) (ตารางที่ 4) จากการที่ไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ผลิตได้ในปริมาณสูงมากกว่า 3.3 เท่าของ *S. carpocapsae* เป็นผลจากสายพันธุ์ไทยมีวงจรชีวิตสั้น (4-5 วัน) ใช้เวลาเพาะเลี้ยงเพียง 7 วันเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ต่างประเทศมีวงจรชีวิตยาวกว่า (7-8 วัน) ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่า (15 วัน) นอกจากนั้น ผลผลิตที่ได้ของสายพันธุ์ไทยสูงกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ จึงส่งผลต่อต้นทุนการผลิตและผลผลิตที่ได้ต่อเดือนมีความแตกต่างกัน

จากการทดสอบศักยภาพ (quality control) ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยที่ผลิตได้จากอาหารแข็งกึ่งเหลว 14 สูตร พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบระหว่าง 77-86 % และในสูตร NT14 NT8 และ NT5 มีศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบตายเท่ากับ 86 80 และ 81 % ในเวลา 48 ชม. ตามลำดับ ซึ่งค่า quality control มีความแตกต่างเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากหนอนของแมลงอาศัย (host) ซึ่งทำให้หนอนทดสอบตายได้ 89 % ในเวลาเท่ากัน

สูตรอาหารเพาะเลี้ยงและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย จึงเป็นสิ่งสำคัญของกระบวนการผลิตในเชิงพาณิชย์ให้มีต้นทุนต่ำผลผลิตสูง ซึ่งจากผลการวิจัยสามารถพิจารณาคัดเลือกอาหาร 3 สูตรนี้ เข้าสู่กระบวนการผลิต ได้กำหนดชื่อใหม่คือ KDSM SBSM และ DFSM ของสูตรอาหาร NT14 NT8 และ NT5 ตามลำดับ ดังนั้น แนวโน้มของการนำสายพันธุ์ไทยเข้าสู่กระบวนการผลิตให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม จึงเป็นแนวทางที่ควรพัฒนาอย่างต่อเนื่องต่อไป

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตต่อ 1 เดือน แสดงต้นทุน แรงงาน และผลกำไรที่ได้ ของการผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์การค้า *(Steinernema carpocapsae)* และสายพันธุ์ไทย (*S. thailandense*) ในอาหารเทียม

รายการ	สายพันธุ์การค้าผลิตในอาหารชนิด[1/]		สายพันธุ์ไทยผลิตในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว
	แข็งกึ่งเหลว	ชนิดเหลว	
1. ความสามารถในการผลิตต่อเดือน	7,680 ล้านตัว	32,000 ล้านตัว	25,440 ล้านตัว
2. ต้นทุนอาหาร	3,267 บาท	12,150 บาท	2,400 บาท
3. ต้นทุนแรงงาน	20,500 บาท	23,000 บาท	15,000 บาท
4. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์) คิด 60% ของต้นทุนอาหาร+แรงงาน	14,260 บาท	21,090 บาท	10,440 บาท
5. รวมต้นทุน 2+3+4	38,027 บาท	56,240 บาท	27,840 บาท
บรรจุเป็นผลิตภัณฑ์ (4 ล้านตัว/ซอง)	1,920 ซอง	8,000 ซอง	6,360
คิดเป็นต้นทุนการผลิตต่อซอง (บาท)	19.80 บาท	7.03 บาท	4.38
คิดเป็นมูลค่าการขาย (1 ซอง 35 บาท)	1,920 x 35 = 67,200	8,000 x 35 = 280,000	6,360 x 35 = 222,600
คิดเป็นผลกำไรที่ได้ (มูลค่าการขาย-ต้นทุน)	29,173 บาท	223,760 บาท	194,760 บาท

ข้อแตกต่างของการผลิต

1. สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

    1.1 สายพันธุ์ที่ผลิตเป็นการค้า

    - อาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว ใช้สูตรอาหารสุนัขสำเร็จรูป + น้ำมันหมู + น้ำกลั่น

    – อาหารเหลวใช้สูตร Tsb3 (Tryptic soy broth 0.75% + yeast extract 0.5% + egg yolk 3.3%

    1.2 สายพันธุ์ไทย

    - อาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว ใช้สูตร KDSM (ไตหมู 50% + น้ำมันหมู 20% + น้ำกลั่น 30%)

2. ค่าแรงงาน

    2.1 สายพันธุ์การค้า แรงงานประกอบด้วย นักวิชาการระดับปริญญาตรี 1 คน คนงาน 3 คน

    2.2 สายพันธุ์ไทย แรงงานประกอบด้วย ปวส. 1 คน คนงาน 2 คน

[1/] จากเอกสาร โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า (วัชรี และคณะ, 2542)

4.2 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว

4.2.1 ผลของระดับ pH ในอาหารเพาะเลี้ยง

จากการทดลองปรับระดับ pH ในอาหารแข็งกึ่งเหลว 3 สูตร คือ SBSM DFSM และ KDSM ตั้งแต่ระดับ 3 4 5 6 7 8 9 และไม่ปรับ pH เป็น control ที่ใช้เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. thailandensis* n. sp. ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ระดับ pH ที่เหมาะสมของอาหารทั้ง 3 สูตร อยู่ช่วง pH เท่ากับ 6-7 และดีที่สุดคือ อาหารที่มีการปรับ pH เท่ากับ 7 ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดและมีค่าความแตกต่างกันในทางสถิติ เมื่อพิจารณาในแต่ละสูตรอาหารพบว่า สูตรอาหาร SBSM ให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อปรับ pH อาหารเป็น 6 เท่ากับ 15.56 ล้านตัวต่ออาหาร 25 กรัม เปรียบเทียบกับไม่ปรับ pH (6.86) ให้ผลผลิตเท่ากับ 12.32 ล้านตัว ในสูตรอาหาร DFSM เมื่อปรับ pH เป็น 7 ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าไม่ปรับ pH (5.18) โดยมีผลต่างของผลผลิตที่นับได้เท่ากับ 3.3 ล้านตัว (15.15-11.85) สำหรับในสูตรอาหาร KDSM ซึ่งเป็นอาหารที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ พบว่า การไม่ปรับ pH ในอาหารให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงเท่ากับ 15.37 ล้านตัว และไม่แตกต่างจากการปรับ pH เป็น 7 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ระดับของ pH อาหาร มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย โดยระดับ pH เป็นกลาง-ด่าง (7-9) ให้ผลผลิตสูงกว่า pH เป็นกรด-กรดอ่อน (3-4) (ตารางที่ 5)

4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. ในอาหารแข็งกึ่งเหลว 3 สูตร คือ SBSM DFSM และ KDSM ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย นำไปวางที่ระดับอุณหภูมิ 15 20 25 30 35°ซ และที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ (control) เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่า ระดับของอุณหภูมิมีผลต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย โดยทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้เพิ่มขึ้นหรือลดลงตามความแตกต่างของระดับอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ในสูตรอาหาร KDSM พบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าอาหารสูตร SBSM และ DFSM ในทุกระดับอุณหภูมิ และสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ เท่ากับ 18.59 ล้านตัวต่ออาหาร 25 กรัม รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ ในอาหารสูตร KDSM ให้ผลผลิตเท่ากับ 17.42 ล้านตัว น้อยกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ เพียง 1.2 ล้านตัวต่ออาหาร 25 กรัม ส่วนการนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ (15°ซ) ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยต่ำสุดในทุกสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบ และการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (35°ซ) ให้ผลผลิตในช่วงระหว่าง 3-4 ล้านตัวตัวต่ออาหาร 25 กรัมของทั้ง 3 สูตรอาหาร ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยและให้ผลผลิตสูงสุดในทุกสูตรอาหารอยู่ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วงระหว่าง 11-18 ล้านตัวตัวต่ออาหาร 25 กรัม ของ 3 สูตรอาหาร (ตารางที่ 6)

5.2.3 อิทธิพลของแสงขณะเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาอิทธิพลของแสงในขณะเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *S. thailandense* n. sp. ในอาหารแข็งกึ่งเหลว 3 สูตร คือ SBSM DFSM และ KDSM สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองการวาง culture ในที่มีแสง ในที่มืด และในที่มีแสงสลับปกติ (control) ในขณะเพาะเลี้ยง พบว่าแสงมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้แตกต่างกันทางสถิติ โดยการวาง culture ในที่มืดตลอดการเพาะเลี้ยง 7 วัน ให้ผลผลิตสูงที่สุดในทุกสูตรอาหาร และสูตรอาหาร KDSM ให้ผลผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 17.74 ล้านตัว รองลงมาคือสูตร DFSM และ SBSM เท่ากับ 11.72 และ 10.70 ล้านตัวต่ออาหาร 25 กรัม ตามลำดับ ส่วนการวาง culture ในสภาพมีแสงตลอดการเพาะเลี้ยง 7 วัน ทำให้ผลผลิตของไส้เดือนฝอยในทุกสูตรอาหารลดลงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในที่มืดหรือมีแสงสลับปกติ เมื่อพิจารณาแต่ละสูตรอาหารที่ทำการทดลองพบว่า สูตร SBSM ให้ผลผลิตสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในที่มืด โดยให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าประมาณ 2 ล้านตัวของการเลี้ยงสภาพมีแสงและแสงสลับปกติ ส่วนในสูตร DFSM และ KDSM ให้ผลผลิตสูงในการเพาะเลี้ยงในที่มืดเช่นกัน และให้ผลผลิตลดลงเมื่อเลี้ยงในสภาพให้แสงสลับปกติ และผลผลิตต่ำที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพมีแสง (ตารางที่ 7)

ไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. มีคุณสมบัติทนร้อนได้สูงถึง 35-38°ซ และมีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด (Tangchitsomkid, 2000) และยังเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (Thai strain) ชนิดใหม่ (new species) ที่ทำการคัดเลือกศักยภาพในการเป็น bio-pesticide เทียบได้กับสายพันธุ์การค้าในปัจจุบัน และเพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารแข็งกึ่งเหลวราคาถูก การนำสายพันธุ์ไทยเข้าสู่กระบวนการผลิตเพื่อขยายผลในเชิงพาณิชย์ที่ต้องคำนึงถึงต้นทุนต่ำและให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูง ดังนั้น การทดลองเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยที่มีความแตกต่างของระดับอุณหภูมิ pH อาหาร และสภาพการเลี้ยงในที่มีแสง-ที่มืด จัดเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในสภาพการเลี้ยงใน monoxenic medium ส่งผลต่อปริมาณผลผลิตที่ได้ และจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของผลผลิตโดยวิธี DMRT พบว่า มีความแตกต่างทางสถิติในทุกปัจจัยที่ทำการทดลอง สอดคล้องกับ Kaya (1977) และ Pye and Burman (1978) ซึ่งรายงานอิทธิพลของอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยง มีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญเป็นตัวเต็มวัย (maturation) และการขยายพันธุ์ (reproduction) ของไส้เดือนฝอย steinernematid และ heterorhabditid และรายงานของ Dunphy and Webster (1989) พบว่าการวาง culture ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °ซ ทำให้ได้ผลผลิตสูงในไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* DD136 และ *H. heliothidis* ตามลำดับ นอกจากนั้น Heimpel (1955) พบว่าน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง ซึ่งเป็นแมลงอาศัยของไส้เดือนฝอยในกลุ่มศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode) มีค่า pH เท่ากับ 6.2 ดังนั้น การเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมที่มี pH 6 ถึงเป็นกลางหรือ pH 7 ทำให้ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าการเพาะเลี้ยงสภาพกรดอ่อน (3-5) หรือด่างอ่อน (8-9)

ตารางที่ 5 ผลผลิตของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandense* n. sp. จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตร SBSM DFSM และ KDSM ที่มีการปรับระดับ pH ของอาหาร ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture เป็นเวลา 7 วัน

ระดับ pH อาหาร	ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย ($x10^6$) ต่ออาหาร 25 กรัม ของอาหาร 3 สูตร		
	SBSM	DFSM	KDSM
pH 3	1.14 e[1/]	1.27 f	2.22 f
pH 4	3.04 d	2.44 e	4.67 e
pH 5	9.92 c	8.88 c	9.06 d
pH 6	15.56 a	12.22 b	12.12 c
pH 7	12.00 b	15.15 a	15.08 a
pH 8	10.29 c	11.85 b	13.26 b
pH 9	9.61 c	8.03 d	11.35 c
ไม่ปรับ pH (control)[2/]	12.32 b	11.85 b	15.37 a
CV. (%)	7.62	6.54	6.38

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % คำนวณโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

[2/]ไม่ปรับ pH สูตร SBSM เท่ากับ 6.8 สูตร DFSM เท่ากับ 5.2 และสูตร KDSM เท่ากับ 6.6

ตารางที่ 6 ผลผลิตของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandense* n. sp. จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตร SBSM DFSM และ KDSM ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture เป็นเวลา 7 วัน

ระดับอุณหภูมิ (°ซ)	ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย (x10^6) ต่ออาหาร 25 กรัม ของอาหาร 3 สูตร		
	SBSM	DFSM	KDSM
15	0.14 e[1/]	0.19 f	0.28 f
20	10.57 b	9.73 c	13.18 c
25	12.07 a	11.96 a	18.59 a
30	8.51 c	8.40 d	11.33 d
35	3.49 d	4.04 e	4.39 e
อุณหภูมิ 26±2 (control)	10.29 b	10.93 b	17.42 b
CV. (%)	6.23	5.74	5.03

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % คำนวณโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ตารางที่ 7 ผลผลิตของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandense* n. sp. จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสูตร SBSM DFSM และ KDSM วางในที่มีแสง ที่มืด และแสงสลับ ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture เป็นเวลา 7 วัน

สภาพแสงในขณะเพาะเลี้ยง	ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย (x10^6) ต่ออาหาร 25 กรัม ของอาหาร 3 สูตร		
	SBSM	DFSM	KDSM
มีแสง	8.14 b[1/]	7.84 c	13.36 c
ที่มืด	10.70 a	11.72 a	17.74 a
แสงสลับ (control)	8.04 b	10.54 b	15.72 b
CV. (%)	8.62	7.34	5.07

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % คำนวณโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยให้ผลผลิตสูงในอาหารเทียม สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในสภาพอุณหภูมิ 26+2 °ซ ให้ผลผลิตสูงถึง 16-18 ล้านตัวต่ออาหารแข็งกึ่งเหลวสูตร KDSM น้ำหนัก 25 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. หรือโดยประมาณเท่ากับ 600 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร วางในสภาพที่ไม่ต้องควบคุมอุณหภูมิห้องเพาะเลี้ยงหรือไม่มีความจำเป็นต้องใช้ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25°ซ ตลอด 24 ชม. จึงช่วยลดต้นทุนการผลิตลง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต *S. carpocapsae* สายพันธุ์การค้าสภาพการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารสุนัข ได้ผลผลิตเพียง 4 ล้านตัวต่ออาหารน้ำหนัก 40 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. (วัชรี และ พิมลพร, 2540) ผลผลิตสายพันธุ์ไทยสูงกว่าถึง 4-4.5 เท่า ทำให้ต้นทุนการผลิตของสายพันธุ์ไทยต่ำกว่าสายพันธุ์การค้า

ดังนั้น ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยจึงเหมาะที่จะนำมาพัฒนาการผลิตให้ได้เป็นเทคโนโลยีที่สามารถถ่ายทอดสู่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร (สวพ.) กรมวิชาการเกษตร ศูนย์ส่งเสริมเกษตรชีวภาพและโรงเรียนเกษตรกร กรมส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ เป็นต้น เพื่อการผลิตแจกจ่ายสู่เกษตรกรในพื้นที่ รวมทั้งการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสู่ภาคเอกชนและขยายผลต่อในเชิงพาณิชย์ เพื่อได้ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยราคาถูกลงและได้สายพันธุ์ไทย เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเลือกใช้ไส้เดือนฝอยหลากหลายชนิดในการควบคุมแมลงศัตรูพืชของเกษตรกรต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การจำแนกชนิด คัดเลือกสายพันธุ์และการผลิตขยายปริมาณไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema* sp. เพื่อการใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เป็นโครงการวิจัยซึ่งอยู่ภายใต้ชุดโครงการ **การพัฒนาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง *Steinernema* spp. สายพันธุ์ไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช** ซึ่งต่อยอดจากงานวิจัย การสำรวจเก็บรวบรวมและจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2540-2542 ชุดโครงการดังกล่าว ประกอบด้วย 4 โครงการวิจัย ที่มีความเชื่อมโยงเป็นชุดโครงการครบวงจร (package project) การดำเนินงานวิจัยในแต่ละกิจกรรมให้ผลการวิจัยที่เชื่อมต่อกัน โดยมีเป้าหมายหลักคือ การพัฒนาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทยชนิดใหม่ให้นำไปใช้เป็น bio-pesticide ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชในสภาพไร่-นา อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นรูปธรรม โดยงานวิจัยเริ่มตั้งแต่การศึกษาวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์ให้คงความมีชีวิตและเป็นแหล่งเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในประเทศไทยเพื่อนำไปใช้ทั้งในด้านงานวิจัยพื้นฐานสู่งานวิจัยประยุกต์และพัฒนาไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นระบบและครบวงจร

สรุปผลรวมของชุดโครงการวิจัยซึ่งประกอบด้วย 6 งานวิจัย ที่มีความเชื่อมโยงต่อเนื่อง เริ่มจากการเก็บรวบรวม จัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของแต่ละไอโซเลท จากนั้นนำมาศึกษาชีววิทยาและทดสอบศักยภาพของสายพันธุ์ในการเป็น bio-pesticide และทำการคัดเลือกสู่กระบวนการผลิตขยายปริมาณเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตร โดยผลงานวิจัยสรุปผลดังต่อไปนี้ :-

1. เก็บรักษาไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในประเทศไทย รวม 11 ไอโซเลท ให้คงความมีชีวิตในสภาพที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ และกำหนดรหัสไส้เดือนฝอยตามพื้นที่สำรวจคือ KB PC AY KS MK KK NK SK NN RE และ UB code แต่ละไอโซเลทเก็บรวบรวมในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 25 °ซ ไว้ ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. แบ่งแยกชนิดและจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคการผสมข้ามชนิด (cross mating) สามารถจัดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 1) KS MK KK NK NN REs และ KB (*S. thailandense* n. sp.) 2) AY 3) SK และ 4) UBs

3. ตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate โดยใช้วิธีการทางอณูชีวโมเลกุลด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากผล RFLP pattern ของดีเอ็นเอ สามารถแสดงความชัดเจนของชนิดไส้เดือนฝอย จำแนกเป็น *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากจังหวัดพระนครศรีอยุธยา (AY code) และ *Steinernema* sp. ที่แยกได้จากจังหวัดสระแก้ว (SK code) ออกจาก *S. thailandense* n. sp. ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี (KB code)

4. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*S. thailandense* n. sp.) เพื่อการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้า (*S. carpocapsae*) ผลการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ไทยมีการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ในตัวหนอนทดสอบ (*G. mellonella*) 1 วงจรชีวิต ใช้เวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 26+2 °ซ เมื่อนำไปศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการขยายพันธุ์ของสายพันธุ์ไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์

ต่างประเทศ พบว่าสายพันธุ์ไทยมีอัตราการขยายพันธุ์ได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-35°ซ และเหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 30 °ซ มีวงจรชีวิตสั้นที่สุด 4 วัน (96 ชม.) ในสายพันธุ์ต่างประเทศอยู่ระหว่าง 20-30 °ซ และเหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 25 °ซ มีวงจรชีวิตสั้นที่สุด 5 วัน (120 ชม.)

5. การคัดเลือกสายพันธุ์ไทยให้เข้าสู่กระบวนการผลิตในเชิงพาณิชย์ ใช้เทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยชีววิธีเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศ ผลการทดลองเทคนิค quadrant plate พบว่า สายพันธุ์ไทยมีผลรวมค่าระยะทางเฉลี่ย (mean distance, $\bar{\chi}$) ในการเคลื่อนที่เข้าหาหนอนเหยื่อล่อ ($\bar{\chi}$ = 1.20) ใกล้เคียงสายพันธุ์ต่างประเทศ ($\bar{\chi}$ = 1.06) ภายในเวลา 30 นาที และจากการทดสอบด้วยเทคนิค migration in sand column พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีการเคลื่อนที่ในดินทรายตามแนวดิ่งระยะทาง 5 ซม. เข้าทำลายหนอนเหยื่อล่อได้เท่ากัน (100 %) ในเวลา 5 วัน นอกจากนั้น การทดสอบความทนทานของไส้เดือนฝอยต่ออุณหภูมิสูง (heat tolerance) และแสงแดดช่วงเวลาต่างๆ (exposure to sunlight) พบว่า สายพันธุ์ไทยมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูง (25-35 °ซ) และคงศักยภาพในการฆ่าหนอนตาย 97-100 % และที่อุณหภูมิสูงถึง 40 °ซ ยังคงฆ่าหนอนได้ (43 %) แตกต่างกับสายพันธุ์ต่างประเทศซึ่งพบว่าไม่ทนทานต่ออุณหภูมิสูง (35-40 °ซ) แต่ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำ (15-20 °ซ) ได้ดีกว่าสายพันธุ์ไทย ส่วนการทดสอบแสงแดดในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความทนทานต่อแสงแดดใกล้เคียงกัน และมีศักยภาพในการฆ่าแมลงตาย 83-100 % เมื่อไส้เดือนฝอยถูกแสงแดดในช่วงเช้า (6.00-10.00 น.) และศักยภาพในการฆ่าลดลง (43-50 %) เมื่อถูกแสงแดดช่วงเย็น (16.00-18.00 น.)

6. ผลการศึกษาสูตรอาหารเทียมดัดแปลงชนิดแข็งกึ่งเหลว 14 สูตร พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้ดีในอาหารดัดแปลงราคาถูก 3 สูตร คือ DFSM SBSM และ KDSM ให้ผลผลิตเท่ากับ 476 488 และ 636 ล้านตัว ต่ออาหาร 1 ลิตร ต้นทุนอาหารเท่ากับ 21 26 และ 60 บาท ตามลำดับ ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเทียมสามารถฆ่าหนอนทดสอบตายได้ 80-86% เทียบได้กับไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากแมลงอาศัย ซึ่งฆ่าหนอนทดสอบตายได้ 89% ในเวลาเท่ากัน และจากการศึกษาปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงและผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้รับพบว่า ปัจจัยต่างๆ มีอิทธิพลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารแข็งกึ่งเหลวสูตร DFSM SBSM และ KDSM โดย pH ของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเท่ากับ 6-7 และการตั้งวางเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ ให้ผลผลิตสูงที่สุดของอาหารทั้ง 3 สูตร และการวางภาชนะเพาะเลี้ยงในที่มืดทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าการวางในที่มีแสงหรือมีแสงสลับ (กลางวัน-กลางคืน)

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. กรมวิชาการเกษตร เป็นแหล่งเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทยของประเทศ ที่เก็บรักษาไส้เดือนฝอยให้คงความมีชีวิตและสามารถนำไอโซเลทต่างๆ ไปพัฒนาใช้ประโยชน์ต่อไป รวมทั้งเพื่อการอนุรักษ์ความหลากหลายของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์พื้นเมืองที่พบในประเทศไทย

2. เป็นแหล่งข้อมูลวิชาการทางด้านไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงของงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ได้แก่ การจัดจำแนกในระดับชนิดและสายพันธุ์ด้วยวิธีการตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา cross mating และเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุล ตลอดจนวิธีการศึกษาทางชีววิทยา และเทคนิคการผลิตเพื่อขยายปริมาณในอาหารเทียมที่ดัดแปลงวิธีการจาก Bedding (1981) ให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ ประหยัดและต้นทุนต่ำ

3. ผลงานวิจัยของโครงการนี้ เราสามารถคัดเลือกได้ *S. thailandense* n. sp. ที่มีศักยภาพเทียบได้กับสายพันธุ์ต่างประเทศที่ผลิตเป็นการค้าในปัจจุบัน แยกได้ symbiotic bacteria เป็น stock culture เพื่อใช้ในการผลิตในอาหารเทียม ได้สูตรอาหารแข็งกึ่งเหลวราคาต่ำและให้ผลผลิตสูง รวมถึงปัจจัยการผลิตที่เหมาะสม ผลงานนี้สามารถนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเข้าสู่กระบวนการผลิตที่สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสู่หน่วยงานที่เกี่ยวข้องและ/หรือภาคเอกชนเพื่อการขยายผลในเชิงพาณิชย์ต่อไป

4. ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลวสูตร KDSM ได้นำแจกจ่ายแก่เกษตรกรที่สนใจ และโครงการหมู่บ้านจุฬาภรณ์พัฒนา จ.นราธิวาส เพื่อทดสอบศักยภาพในการกำจัดแมลงและประเมินผลในสภาพไร่ รวมทั้งผลิตเพื่องานวิจัยทดสอบศักยภาพของสายพันธุ์ไทยในสภาพเรือนทดลองและสภาพไร่ ร่วมกับนักกีฏวิทยาของสถานีทดลองพืชสวนกาญจนบุรี และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะและผลที่คาดว่าจะได้รับ

ไส้เดือนฝอยในกลุ่ม steinernematid เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการเป็น bio-pesticide กำจัดแมลง และไม่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมหรือเป็นพิษต่อพืชและสัตว์รวมทั้งมนุษย์ งานวิจัยทางด้านนี้ในยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น จีน และออสเตรเลีย ให้ความสำคัญและมีการศึกษาวิจัยโดยเฉพาะสายพันธุ์ในท้องถิ่น ในประเทศไทยจึงควรสนับสนุนให้มีการศึกษาวิจัยและสร้างบุคลากรที่ยังขาดแคลนให้เพิ่มขึ้น เพื่อการพัฒนาให้เกิดประโยชน์กับงานไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้น องค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ในปัจจุบันได้นำเข้าสู่เทคโนโลยีการผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารแข็งกึ่งเหลว โดยมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ คือ 1) เพื่อหากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง ที่เป็นเทคโนโลยีอย่างง่ายและต้นทุนต่ำและสามารถถ่ายทอดสู่เกษตรกรผลิตใช้เองในท้องถิ่น 2) เพื่อหากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง ที่เป็นเทคโนโลยีในเชิงพาณิชย์ในระดับโรงงานขนาดเล็กที่มีงบลงทุนต่ำ และสามารถถ่ายทอดสู่หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร (สวพ.) กรมวิชาการเกษตร ศูนย์ส่งเสริมเกษตรชีวภาพและโรงเรียนเกษตรกร กรมส่งเสริมการเกษตร เป็นต้น เพื่อการผลิตแจกจ่ายสู่เกษตรกรในพื้นที่ รวมทั้งการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตสู่ภาคเอกชนและขยายผลต่อในเชิงพาณิชย์เพื่อการจำหน่าย งานวิจัยเทคโนโลยีการผลิตนี้เริ่มดำเนินการตั้งแต่ปี 2543 คาดว่าจะสิ้นสุดในปี 2547 ซึ่งในอนาคตจะเกิดประโยชน์ต่อการเกษตรของประเทศ โดยเกษตรกรสามารถผลิตไส้เดือนฝอยใช้เอง หรือมีหลายหน่วยงานมีความรู้ในการผลิตไส้เดือนฝอยเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการใช้กว้างขวาง ผลที่ตามมาคือเกิดประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อครอบครัว ชุมชน และสังคมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2541 ก. ความก้าวหน้าของงานวิจัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. หน้า 9-13. ใน : จุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารประกอบนิทรรศการ “งานเกษตรแฟร์” 31 มกราคม - 7 กุมภาพันธ์ 2541 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2541 ข. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ไทย *Steinernema thailandensis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae). *วารสารวิชาการเกษตร*. 16 (3) : 185-193.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด พรพิมล อธิปัญญาคม และสาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2543. งานวิจัยและพัฒนาไส้เดือนฝอย *Steinernema* spp. Thai isolate เพื่อควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี. หน้า 31-32. ใน *:* รายงานประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา 8-10 มีนาคม 2543 ณ โรงแรมลองบีช เพชรบุรี.

พากเพียร อรัญนารถ นงรัตน์ นิลพานิชย์ วิชิต ศิริสันธนะ และสมคิด ดิสถาพร. 2543. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. *ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา*. 10 (2) : 2-8.

วัชรี สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 182-197. ใน : เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

วัชรี สมสุข และ พิมลพร นันทะ. 2540. โครงการนำร่องการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema* (*Neoaplectana*) *carpocapsae*. หน้า 331-336. ใน : เอกสารวิชาการ การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

วัชรี สมสุข สุทธิชัย สมสุข และ พิมลพร นันทะ. 2542. เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ด้วยวิธีการต่างๆ. หน้า 104-108. ใน : รายงานผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส เอ็น พี วี, หน้า 140-145. ใน : หลักและวิธีการผลิตผักอนามัย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที สารชีวินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช. หน้า 146-148. ใน : หลักและวิธีการผลิตผักอนามัย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

Aguillera, M.M.; N.C. Hodge; R.E. Stall and G.C. Smart Jr. 1993. Bacterial symbionts of *Steinernema scapterisci*. *J. Invertebrate Pathol.* 62 : 68-72.

Akhurst, R.J. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121 : 303-309.

Akhurst, R.J. 1982. Bacterial Symbionts of Insect Pathogenic Nematodes of the Families Steinernematidae and Heterorhabditidae. Ph.D. thesis. University of Tasmania, Hobart.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1988. A numerical taxonomy study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposal elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species. *J. Gen. Microbiol.* 134 : 1835-1845.

Akhurst, R.J. and N.E. Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. Pages 75-90. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Amarasinghe, L.D.; W.M. Hominick; B.R. Briscoe and A.P. Reid. 1994. Occurrence and distribution of entomopathogenic nematodes in Sri Lanka. *J. Helminthol.* 68 : 277-286.

Bedding, R.A. 1981. Low cost *in vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27 : 109-114.

Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104 : 117-120.

Bedding, R.A. and A.S. Molyneux. 1982. Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae : Nematoda). *Nematologica* 28 : 354-359.

Bedding, R.A. and R.J. Akhurst. 1975. A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21 : 109-110.

Boemare, N.E. and R.J. Akhurst. 1988. Biochemical and hisiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *J. Gen. Microbiol.* 134 : 751-761.

Boemare, N.E.; R.J. Akhurst and R.G. Mourant. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. Int. *J. Syst. Bacteriol.* 43 : 249-255.

Bovien, P. 1937. Some types of association between nematodes and insects. Page 114. *Cited by* G.O. Poinar, Jr. Redescription of *Neoaplectana affinis* Bovien (Rhabditida : Steinernematidae). Revue de Nematologie Vol. 11. 5 p.

Burman, M. 1982. *Neoaplectana carpocapsae* : toxin production by axenic insect parasitic nematodes. *Nematologica* 28 : 62-70.

Burman, M.; K. Abrahamsson; J. Ascard; A. Sjoberg and B. Eriksson. 1986. Distribution of insect parasitic nematodes in Sweden. Page 312. In : Proceedings, 4th International Colloquium of Invertebrate Pathology, Veldhoven, The Netherlands.

Cabanillas, H.E.; G.O. Poinar, Jr. and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Texas. *Fundam. Appl. Nematol.* 17 : 123-131.

Campbell, J.F. 1994. Host finding bioassays on agar : quadrant plate bioassay. Pages 209-210. In : COST 812 Biotechnology : Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Proceeding of symposium and workshop, St. Patrick's College, Manooth, Co. Kildare, Ireland.

Campbell, J.F. and R. Gaugler. 1993. Nictation behavior and its ecological implications in the host search strategies of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae). *Behavior* 126 : 155-169.

Curran, J. 1991. Application of DNA Analysis to Nematode Taxonomy. Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra, Australia. 215 pp.

Curran, J.; D.L. Baille and J.M. Webster. 1985. Use of genomic DNA restriction fragment length differences to identify nematode species. *Parasitol.* 90 : 137-144.

De Doucet, M.M.A. 1986. A new species of *Neoaplectana* Steiner, 1929 (Nematoda : Steinernematidae) from Cordoba, Argentina. *Revue de Nematologie* 9 : 317.

De Doucet, M.M.A. and M. Doucet. 1990. *Steinernema ritteri* n.sp. (Nematoda : Steinernematidae) with a key to the species of the genus. *Nematologica* 36 : 257-265.

Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1989. The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD 136 and *Heterorhabditis heliothidis*. *Revue de Nematologie* 12 : 113-123.

Dutky, S.R., J.V. Thompson, G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. *J. Insect Pathol.* 6 : 417-422.

Ehlers, R.-U. 1995. Introduction of Non-endemic Nematodes for Biological Control : Scientific and Regulatory Policy Issues. COST & OECD Workshop. Bruhnskoppel-Seminarhotel Malente, Germany. 17 pp.

Ehlers, R.U. and A. Peters. 1995. Entomopathogenic nematodes in biological control : feasibility, perspectives and possible risks. Pages 119-136. In : Biological Control, Benefits and Risks. OECD, Cambridge University Press, Cambridge.

Elawad, S.A.; W. Ahmad and A.P. Reid. 1997. *Steinernema abbasi* sp. n. (Nematoda : Steinernematidae) from the Sultanate of Oman. *Fundam. Appl. Nematol.* 20(5) : 435-442.

Elawad, S.A.; S.R. Gowen and N.G.M. Hague. 1999. The life cycle of *Steinernema abbasi* and *S. riobrave* in *Galleria mellonella*. *Nematol.* 1(7-8) : 762-764.

Filipjev, I.N. 1934. Micellanea Nematologica 1. Eine neue Art der Gattung *Neoaplectana* Steiner nebst Bermerkungen uber die systematische Stellung der letzteren. (English translation from Russian). *Magazine de Parasitologie de 1'Institut Zoologique de 1'Academie de 1'USSR* 4 : 229-239.

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. Pages 153-172. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Gardner, S.L.; S.P. Stock and H.K. Kaya. 1994. A new species of *Heterorhabditis* from the Hawaiian islands. *J. Parasitol.* 80 : 100-106.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 365 pp.

Georgis, R. 1981. Studies on *Neoaplectana carpocapsae* in the web-spinning larch sawfly, *Cephalcia lariciphila*. Ph.D. thesis, University of Reading, UK.

_____ . 1992. The role of biotechnology companies in commercialization of entomopathogenic nematodes. Pages 294-306. In : Nematology from Molecule to Ecosystem. European Society of Nematologists, Inc. Inwergrowie, Dundee, Scotland.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

Glazer, I. 1994. Nematode tolerance bioassays. Pages 211-212. In : COST 812 Biotechnology : Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Proceeding of symposium and workshop, St. Patrick's College, Manooth, Co. Kildare, Ireland.

Grewal, P.S.; R. Gaugler; H.K. Kaya and M. Wusaty. 1993. Infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* (Nematoda : Steinernematidae). *J. invertebrate Pathol.* 62 : 22-28.

Griffin, C.T.; J.F. Moore and M.J. Downes. 1991. Occurrence of insect parasitic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in the Republic of Ireland. *Nematologica* 37 : 92-100.

Hashmi, G.; I. Glazer and R. Gaugler. 1996. Molecular comparisons of entomopathogenic nematodes using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Fundam. Appl. Nematol.* 19 (4) : 399-406.

Haukeland, S. 1993. Entomopathogenic nematodes found in Norway. *Norwegian J. Agr. Sci.* 7 : 17-27.

Heimpel, A.M. 1955. The pH in the gut and blood of the larch sawfly, *Pristiphora erichsonii* (Htg) and other species of insects with reference to the pathogenicity of *Bacillus cereus* Fr. & Fr. *Canad. J. Zool.* 33 : 99-106.

Hominick, W.M. and B.R. Briscoe. 1990. Survey of 15 sites over 28 months for entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae). *Parasitol.* 100 : 289-294.

Hominick, W.M.; B.R. Briscoe; F.G. del Pino; J. Heng; D.J. Hunt; E. Kozodoy; Z. Mracek; K.B. Nguyen; A.P. Reid; S. Spiridonov; P. Stock; D. Sturhan; C. Waturu and M. Yoshida. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes : current status, protocols and definitions. *J. Helminthology* 71 : 271-298.

Jian, H.; A.P. Reid and D.J. Hunt. 1997. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda : Steinernematidae) from north-east China. Syst. Parasitol. 37 : 115-125.

Joyce, S.A.; A.P. Reid; E. Driver and J. Curran. 1994. Application of polymerase chain reaction (PCR) methods to the identification of entomopathogenic nematodes. Pages 178-187. In : COST 812 Biotechnology : Genetics of entomopathogenic nematode-bacterium complexes. Proceeding of symposium and workshop, St. Patrick's College, Manooth, Co. Kildare, Ireland.

Kaya, H.K. 1977. Development of DD-136 strain of *Neoaplectana carpocapsae* at constant temperature. *J. Nematol.* 9 : 346-349.

Kaya, H.K. 1990. Soil ecology, pp. 93-115. *In* R. Gaugler and H.K. Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1988. Techniques in Insect Nematology. Department of Nematology University of California, Davis. California. 100 pp.

Klein, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests. Pages 195-214. In **:** Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Kozodoi, E.M. 1984. A new entomophagous nematode *Neoaplectana anomali* sp. n. (Rhabditida : Steinernematidae) and its biology. *Zoologicheskii Zhurnal* 63 : 1605-1909. (Abstract in English).

Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1 Williams & Wilkins, Baltimore. 267 pp.

Liu, J. 1994. A new species of the genus *Heterorhabditis* from China (Rhabditida : Heterorhabditidae). *Acta Zootaxonomica Sinica* 19 : 268-272.

Liu, J. and R.E. Berry. 1996 a. *Steinernema oregonensis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Oregon. *Fundam. Appl. Nematol.* 19 : 375-380.

_____ . 1996 b. *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida : Heterorhabditidae) from Oregon. *J. Invertebrate Pathol.* 67 : 48-54.

Luc, P.V.; K.B. Nguyen; A.P. Reid and S.E. Spiridonov. 2000. *Steinernema tami* sp. n. (Rhabditida : Steinernematidae) from Cat Tien Forest, Vietnam. *Russian J. Nematol.* 8 : 33-43.

Mamiya, Y. 1988. *Steinernema kushidai* n.sp. (Nematoda : Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. *Applied Entomol. Zool.* 23 : 313-320.

Mracek, Z. 1980. The use of "*Galleria traps*" for obtaining nematode parasites of insects in Czechoslovakia (Lepidoptera : Nematoda, Steinernematidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 77 : 378-382.

Mracek, Z.; E.A. Hernandez and N.E. Boemare. 1994. *Steinernema cubana* sp. n. (Nematoda : Rhabditida, Steinernematidae) and the preliminary characterisation of its associated bacterium. *J. Invertebrate Pathol.* 64 : 123-129.

Nguyen, K.B. 1998. Taxonomy of entomopathogenic nematodes. HTTP://GNV.IFAS.UFL. EDU/~KBN/stein.htm.

Nguyen, K.B. and G.C. Smart. 1990. *Steinernema scapterisci* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae). *J. Nematol.* 23 : 187-199.

_____ . 1991. Mode of entry and sites of development of *Steinernema scapterisci* in mole crickets. *J. Nematol.* 23(2) : 267-268.

Nguyen, K.B. and G.C. Smart . 1992 a. Life cycle of *Steinernema scapterisci* Nguyen & Smart, 1990. *J. Nematol.* 24(1) : 160-169.

_____ . 1992 b. *Steinernema neocurtillis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae) and a key to the genus *Steinernema*. *J. Nematol.* 24(4) : 463-477.

_____ . 1994. *Neosteinernema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), a parasite of the termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *J. Nematol.* 26 : 162-174.

_____ . 1996. Identification of entomopathogenic nematodes in the Steinernematidae and Heterorhabditidae (Nemata : Rhabditida). *J. Nematol.* 28(3) : 286-300.

Paul, V.J.; S. Frautschy; W. Fenical and K.H. Nealson. 1981. Antibiotics in microbial ecology : isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *J. Chem. Ecol.* 7 : 589.

Poinar, G.O., Jr. 1972. Nematodes as facultative parasities of insects. *Ann. Rev. Entomol.* 17 : 103-122.

_____ . 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica* 21 : 463-470.

_____ . 1979. Nematodes for Biological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton., 143 p.

_____. 1985. *Neoaplectana intermedia* n.sp. (Steinernematidae : Nematoda) from South Carolina. *Revue de Nematologie* 8 : 321.

_____ . 1986. Recognition of *Neoaplectana* species (Steinernematidae : Rhabditida). *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 53 : 121-129.

Poinar, G.O., Jr. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. Pages 23-61. In **:** Entomopathogenic nematodes in biological control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Poinar, G.O., Jr. and E.M. Kozodoi. 1988. *Necaplectana glaseri* and *N. anomali* : sibling species or parallelism. *Revue de Nematologie* 11 : 13-19.

Poinar, G.O., Jr. and G.M. Thomas. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriacae : Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoaplectana* sp. Steinernematidae). *Parasitol.* 56 : 385-390.

_____ . 1967. The nature of *Achromobacter nematophilus* as an insect pathogen. *J. Invertebrate Pathol.* 9 : 510.

Poinar, G.O., Jr.; G.K. Karunakar and H. David. 1992. *Heterorhabditis indicus* n. sp. (Rhabditida : Nematoda) from India : separation of *Heterorhabditis* spp. by infective juveniles. *Fundam. Appl. Nematol.* 15 : 467-472.

Poinar, G.O., Jr.; T. Jackson and M. Klein. 1987. *Heterorhabiditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae : Rhabditida) parasitic in the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae :Coleoptera), in Ohio. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 54 : 53-59.

Pye, A.E. and M. Burman. 1978. *Neoaplectana carpocapsae* : infection and reproduction in large pine weevil larvae, *Hylobius abietis*. *Parasitol.* 46 : 1-11.

Reid, A.P. and W.M. Hominick. 1992. Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae). *Parasitol*. 105 : 317-323.

Roman, J. and W. Figueroa. 1994. *Steinernema puertoricensis* n.sp. (Rhabditida : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Puerto Rico. *J. Agr. Univ. Puerto Rico* 78 : 167-175.

Shen, C.P. 1992. Description of a entomopathogenic nematode, *Steinernema longicaudum* sp. nov. and its application. Pages 220-231. In : Proceedings of the 19th International Congress of Entomology, Beijing, China.

Siddiqi, M.R. 1986. Tylenchida : Parasites of Plants and Insects. Slough, United Kingdom, Commonwealth Agricultural Bureaux, London. 645 pp.

Steiner, G. 1923. *Aplectana kraussei* n.sp. der Blattwespe *Lyda* sp. parasitierende Nematoden-form, nebst Bemerkungen uber das Steitenorgan der parasitischen Nematoden. Page 24. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

_____. 1929. *Neoaplectana glaseri,*n.g., n.sp. (Oxyuridae), a new nemic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). *J. Wash. Acad. Sci.* 19 : 436.

Steiner, W.A. 1994. Distribution of Entomopathogenic Nematodes in the Swiss Alps. CH-8820 Wadenswill. 268 pp.

Stock, S.P. 1993. A new species of the genus *Heterorhabditis* Poinar, 1975 (Nematoda : Heterorhabditidae) parasitizing *Graphognathus* sp. larvae (Coleoptera : Curcolionidae) from Argentina. *Research and Reviews in Parasitol.* 53 : 103-107.

Stock, S.P.; H.Y. Choo and H.K. Kaya. 1997. An entomopathogenic nematode, *Steinernema monticolum* sp. n. (Rhabditida : Steinernematidae). *Nematologica* 43 : 15-30.

Stock, S.P.; V. Somsook and A.P. Reid. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. *Systematic Parasitol.* 41 : 105-113.

Stoll, N. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, *Neoaplectana glaseri*, in a fluid medium containing raw liver extract. *J. Parasitol.* 39 : 422.

Tallosi, B.; A. Peters and R.U. Ehlers. 1995. *Steinernema bicornutum* sp.n. (Rhabditida : Nematoda) from Vojvodina, Yugoslavia. *Russian J. Nematol.* 3(2) : 71-77.

Tangchitsomkid, N. 2000. A new entomopathogenic nematode (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : Taxonomy, biology and its potential for biological control. Ph.D. thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Vanninen, I.; G.B. Husberg and M.T. Hokkanen. 1989. Occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in cultivated soils in Finland. *Acta Entomologica Fennica* 53 : 65-71.

Waturu, C.N.; D.J. Hunt and A.P. Reid. 1997. *Steinernema karii* sp.n. (Nematoda : Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Kenya. *International J. Nematol.* 7(1) : 68-75.

Weiser, J. 1955. *Neoaplectana carpocapsae* n.sp. (Anguillulata, Steinernematinae), novy cizopasnik housenik obalece jablecneho. *Carpocapsa pomonella* L. *Vestnik Ceskoslovenske Zoologicke Spolecnosti* 19 : 44-52.

Westerman, P.R. and J.M. Godthelp. 1990. The host-searching ability of the insect parasitic nematode *Heterorhabditis* sp. in sand columns. Pages 691-698. In : Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.

Wouts, W.M. 1979. The biology and life cycle of a New Zealand population of *Heterorhabditis heliothidis* (Heterorhabditidae). *Nematologica* 25 : 191-202.

Xu, Z.; G. Wang and X. Li. 1991. A new species of genus *Steinernema* (Rhabditida : Steinernematidae). *Zoological Research* 12 : 17-20.

Yoshida, M.; A.P. Reid; B.R. Briscoe and W.M. Hominick. 1998. Survey of entomopathogenic nematodes (Rhabditida : Steinernematidae and Heterorhabditidae in Japan. *Fundam. Appl. Nematol.* 21(2) : 185-198.

การจำแนกสายพันธุ์เชื้อราสนิมถั่วเหลือง (*Phakopsora pachyrhizi*) โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและลำดับเบส

DNA Fingerprinting and Sequencing of *Phakopsora pachyrhizi* , Soybean Rust Fungus

ศรีสุข พูนผลกุล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคราสนิมของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ (races) และความรุนแรงของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีแตกต่างกัน การจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา 15 สายพันธุ์ จากประเทศไทยโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่ได้จากการใช้ primer ชนิด 10 เบส และชนิด microsattlelite พบว่ามี primer 5 สายได้แก่ UBC 6 UBC 18 UBC 83 UBC84 และ UBC 95 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะแตกต่างกันและใช้ในการจำแนกและจัดกลุ่มดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมได้ อย่างไรก็ตามเชื้อราสนิมในประเทศไทยในแต่ละท้องถิ่นมีความหลากหลายสูงจึงไม่แสดงกลุ่มของท้องที่เก็บตัวอย่างได้

การใช้ลำดับเบสจากการเพิ่มปริมาณด้วย primer ITS4/ITS5 ในส่วนของ ribosomal DNA เพื่อการจำแนกเชื้อรา 7 สายพันธุ์พบว่า เชื้อราสนิมของถั่วเหลืองจากประเทศไทย (THO1-15 และ Thailand) ออสเตรเลีย (Australia 79-1) ไต้หวัน และฟิลลิปปินส์ มีลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS4 และ ITS5 ที่เหมือนกันมากกว่า 99 % และลำดับเบสของเชื้อราสนิมสายพันธุ์จากเปอโตริโก (Puerto Rico)และบราซิล (Brazil 82-1) มีความเหมือนกันมากกว่า 99 % โดยเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มมีลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอยู่ 93 %

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 75 - 206-004

Abstract

Fifteen physiological races of *Phakopsora pachyrhizi* Syd. were used for analysis by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). By using 10 base primers and microsattlelite primers, the reaction types on 10 differential cultivars were compared. The amplification patterns from UBC(University of British Colombia) No. 6, UBC No.18, UBC No. 83, UBC No.84, and UBC No. 95 were used to generate a phenogram. Molecular characteristic from DNA fingerprinting classified soybean rust pathogens into different groups associated with locations.

A molecular sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed space/ ITS4 and ITS5 were used to compare 7 isolated of *Phakopsora pachyrhizi* from Thailand, Australia, Taiwan, Perto Rico, Brazil and Phillippines. The similarity of isolates from Thailand, Australia, Taiwan, and Phillippines were 99 % and the similarity of isolates from Perto Rico, and Brazil were 99 %. Both groups showed 93 % similarity.

คำนำ

โรคราสนิมของถั่วเหลืองที่เกิดจากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi* เป็นโรคที่สำคัญของถั่วเหลืองในประเทศไทย ทำให้ผลผลิตลดลงได้ 10 % ถึง 80 % การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นการควบคุมโรคราสนิมที่ได้ผลคุ้มค่า แต่ในปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์ถั่วเหลืองที่ต้านทานโรคราสนิมนี้อย่างแท้จริง การศึกษายีนในถั่วเหลืองที่ต้านทานต่อโรคราสนิมจำเป็นต้องเข้าใจเชื้อราสาเหตุก่อน เนื่องจากเชื้อสาเหตุของโรคราสนิมนี้มีหลายสายพันธุ์ (races) (Poonpolgul,1997) และความรุนแรงของเชื้อ แต่ละสายพันธุ์มีแตกต่างกันออกไปในลักษณะต้านทาน (incompatible) และลักษณะอ่อนแอ (compatible) ขึ้นกับถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ว่าจะมียีนชนิดใดอยู่ และมีจำนวนยีนต้านทานในแต่ละพันธุ์(cultivar) มากหรือน้อย นั้นยังไม่มีการศึกษามากนัก การศึกษาด้านเทคโนโลยีชีวภาพในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์เป็นวิธีการจำแนกและตรวจสอบเชื้อราสนิมเป็นวิธีการที่ได้ผลดี แม่นยำ และเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการศึกษาความแตกต่างด้านโมเลกุลของเชื้อราสาเหตุทำให้เกิดความเข้าใจในกลไกการเกิดโรคและยีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องในถั่วเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อราสนิมสายพันธุ์ต่าง ๆ
2. สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ
3. สารเคมีใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ
4. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยอีเล็กโตรโฟลิซิส
5. อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการชีวเคมี เช่น เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง ตู้ปรับอุณหภูมิระดับต่าง ๆ ตู้เย็นอุณหภูมิต่ำยิ่งยวด เป็นต้น

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 การจำแนกความแตกต่างของเชื้อราสนิมแต่ละสายพันธุ์ด้วยลายพิมพ์ RAPD โดย เทคนิค Random Amplify Polymorphic DNA

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราสนิม

เก็บตัวอย่างเชื้อราจากแหล่งปลูกถั่วเหลืองที่มีการระบาดของโรคได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ตาก พิษณุโลก เลย นครราชสีมา และอุทัยธานี นำตัวอย่าง เชื้อรามาเพาะเลี้ยงบนใบถั่วเหลือง พันธุ์อ่อนแอ (เชียงใหม่ 60) และแยกเชื้อราบริสุทธิ์ โดยการใช้ไม้ปลายแหลมเขี่ยสปอร์ของเชื้อราจากรอยแผลเดี่ยว ย้ายลงบนใบถั่วเหลืองในจานเลี้ยงเชื้อ ในห้องเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียล มีความชื้นและเก็บภายใต้แสง ฟลูออเรสเซ็นต์ ตลอดเวลา เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำการแยกเชื้อรา สนิมบริสุทธิ์เช่นเดียวกันนี้ซ้ำอีกครั้งหนึ่งเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อราให้มากพอบนใบถั่วเหลืองพันธุ์อ่อนแอ นำสปอร์ของเชื้อราไปทดสอบการเกิดลักษณะต้านทาน (incompatible) และอ่อนแอ (compatible) โดยใช้ลักษณะการตอบสนองของพืชต่อเชื้อรา ซึ่งลักษณะต้านทาน จะพบการเกิดเป็นสีน้ำตาลแดง (Reddish Brown type /RB) ของรอยแผล และสีน้ำตาลอ่อน (Tan type / Tan) สำหรับลักษณะอ่อนแอ ในถั่วเหลือง 6 พันธุ์ คือ PI 459025, PI 200496, PI 270491, Wayne, TK5 และ Anker การคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีดั้งเดิม คัดเลือกเชื้อราสนิมซึ่งเป็นตัวแทนของจังหวัดต่าง ๆ 15 สายพันธุ์ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากพอเพื่อนำสปอร์ของเชื้อราไปทำการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

นำเชื้อราสนิม น้ำหนัก 50-70 ไมโครกรัมในแต่ละสายพันธุ์ ไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการของ Murray and Thomson (1980)โดยเตรียมหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 2 มล. ที่มีเม็ดพลาสติกขนาดเล็ก ในหลอดประมาณ 1.5 มล. เทสปอร์ของเชื้อราลงในหลอด เติมสารสกัด CTAB 1 มล.ลงในหลอด (CTAB ประกอบด้วย Trisma base 6.06 กรัม, cetytrimethyl ammonium bromide 10 กรัม, sodium chloride 20.5 กรัม, EDTA 1.46 กรัม ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 500 มล.) นำหลอดไปเข้าเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 5,000

รอบต่อวินาที นาน 90 วินาที บ่มหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติมสาร ß -mercapto ethanol 1 % จำนวน 2 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบา ๆ ให้สารละลายผสมกันดี บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสต่ออีก 1 ชั่วโมง นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000 รอบต่อวินาที นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 2 มล. หลอดใหม่ เติมสารผสมฟีนอลกับคลอโรฟอร์ม (สัดส่วน 1 ต่อ 1) จำนวน 1 มล. ลงในหลอด เอียงหลอดไปมา เป็นเวลา 10-15 นาที นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ เติมสารผสมคลอโรฟอร์มกับไอโซ -เอมิลแอลกอฮอร์ (สัดส่วน 24 ต่อ 1) จำนวน 1 มล. เอียงหลอดไปมา เป็นเวลา 10-15 นาที นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอดใหม่ เติมเอทานอลแอลกอฮอร์ 99% ที่เย็นจัดจำนวน 2 มล. ลงในหลอด เอียงหลอดเบา ๆ นำไปใส่ในตู้เย็นช่องแช่แข็งเป็นเวลา 10 นาที นำหลอดไป หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที จะพบดีเอ็นเอตกตะกอนเป็นก้อนอยู่ก้นหลอด เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำความสะอาดดีเอ็นเอโดยเติม เอทานอลแอลกอฮอร์ 70% จำนวน 1 มล. ลงในหลอด นำหลอดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง และทำความสะอาดดีเอ็นเอเช่นเดียวกันอีก 2 ครั้ง สุดท้ายให้ เทสารละลายส่วนบนทิ้ง คว่ำหลอดทดลองบนกระดาษซับเพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง เติมสารละลาย TE buffer RNase (ซึ่งประกอบด้วย Tris-EDTA 0.1 M และ RNase 20 นาโนกรัม) จำนวน 30 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดความขุ่น (Spectrophotometer) และการวัดโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน บนแผ่นวุ้น Agarose ทำการปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เป็น 25 ไมโครกรัมต่อมล. เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีสุ่มต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Primer ที่ใช้ในการเป็นตัวตั้งต้นของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มตำแหน่ง เป็น primer ชนิด 10 เบส และชนิด microsatlelite ของ University of British Columbia (UBC) จำนวน 60 สาย เพื่อทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมแต่ละสายพันธุ์ สารเคมีในการทำปฏิกิริยา ครั้งละ 25 ไมโครลิตร ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต่อ 1 ปฏิกิริยา (25 ไมโครลิตร)

dNTP (25mM)	1 ไมโครลิตร
DNA (25 ไมโครกรัม)	1 ไมโครลิตร
Primer (50 ไมโครโมล)	0.33 ไมโครลิตร
Taq polymerase (5 หน่วย/มล)	0.2 ไมโครลิตร
Taq buffer (10X)	2.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	19.97 ไมโครลิตร

นำสารเคมีทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เปิดและอุ่นเครื่องที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที
ขั้นตอนที่ 2 การแยกสายดีเอ็นเอ ที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 primer เกาะสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
ขั้นตอนที่ 4 การต่อสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
(ปฏิบัติขั้นตอน 2 - 4 รวม 45 รอบ)
ขั้นตอนที่ 5 การหยุดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที
ขั้นตอนที่ 6 การพักปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานจนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้แล้วในหลอดทดลองจำนวน 12 ไมโครลิตรผสมกับสีย้อม 3 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในช่อง บนแผ่นวุ้น Agarose 1 % ที่ติดตั้งอยู่บนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วย กระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis) 50 โวลท์ นาน 45 นาที นำแผ่นวุ้นไปย้อมด้วย Ethedium bromide นาน ประมาณ 30 นาที ตรวจสอบแถบสีของดีเอ็นเอด้วยแสงไฟอุลตราไวโอเลต บันทึกภาพแถบสีของดีเอ็นเอที่ปรากฏ

4. **การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ** การเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ใช้การเปรียบเทียบแบบสุ่มที่ตำแหน่งเหมือนกันและแตกต่างกัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS – PC

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง ตุลาคม 2543 ถึง กันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์การทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราสนิม

เชื้อราสนิมถั่วเหลืองที่เก็บได้จากแหล่งปลูกต่าง ๆ จำนวน 69 ไอโซเลท ที่ได้นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์และทดสอบบนถั่วเหลืองทดสอบทั้ง 6 พันธุ์ พบว่าแสดงความแตกต่างของลักษณะแผลสีแดง (RB) และสีน้ำตาลแดง (TAN) ซึ่งใช้เป็นหลักในการจำแนกสายพันธุ์ (Physiological races) พบจำนวน 59 สายพันธุ์ ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ตัวแทนของแหล่งปลูกที่แสดงอาการแตกต่างกันจำนวน 15 สายพันธุ์ไปเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราสำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะแผลสีแดงและสีน้ำตาลแดงของเชื้อราสนิมถั่วเหลือง 15 สายพันธุ์

ไอโซเลท	สายพันธุ์ถั่วเหลืองทดสอบ					
	Ankur	PI230970	PI200492	TK5	TN4	CM60
1 CM-1	RB	RB	RB	RB	RB	RB
2 CM-7	RB	RB	T	RB	RB	T
3 CM-9	T	RB	T	RB	RB	T
4 CM-16	T	RB	RB	RB	T	T
5 KPS-7	T	T	T	RB	T	RB
6 KPS-9	T	T	RB	RB	RB	T
7 KPS-11	T	RB	RB	RB	T	RB
8 KPS-12	RB	RB	RB	RB	T	RB
9 KPS-15	RB	RB	RB	T	RB	RB
10 LOP-1	T	RB	RB	T	RB	RB
11 UTH-1	RB	RB	RB	T	RB	RB
12 PRA-1	RB	T	T	RB	RB	T
13 LOI-2	T	RB	T	RB	RB	RB
14 LOI-4	RB	RB	RB	RB	T	T
15 WAN-1	RB	T	T	T	T	RB

หมายเหตุ CM = ChiangMai (จ. เชียงใหม่) KPS = Kamphaeng Sean (จ.นครปฐม)

LOP = Lopburi (จ. ลพบุรี) LOI = Loei (จ.เลย)

UTH = Uthai Tani (จ. อุทัยธานี) PRA = Prae (จ. แพร่)

WAN = Wangsapung (จ. เลย)

RB = Reddish brown (แผลสีน้ำตาลแดง) T = Tan (แผลสีน้ำตาลเทา)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ทำการทดสอบ primer ชนิดสายเดี่ยว ซึ่งมีลำดับเบสของดีเอ็นเอในแต่ละสาย 10 ลำดับ (decamer primers) และสายเดี่ยวที่มีจำนวนซ้ำของเบสบนสาย (microsatlelite primers) ของ University of Columbia, Canada จำนวน ทั้งสิ้น 60 สาย จากการทดสอบโดยตรวจดูด้วยแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ บน agarose ที่ย้อมสีด้วย Ethedium bromide พบว่ามี primers เพียง 12 สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากกว่า 1 แถบ และมี primer เพียง 5 สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะเดียวกัน คือ UBC 6 UBC 18 UBC 83 UBC84 และ UBC 95

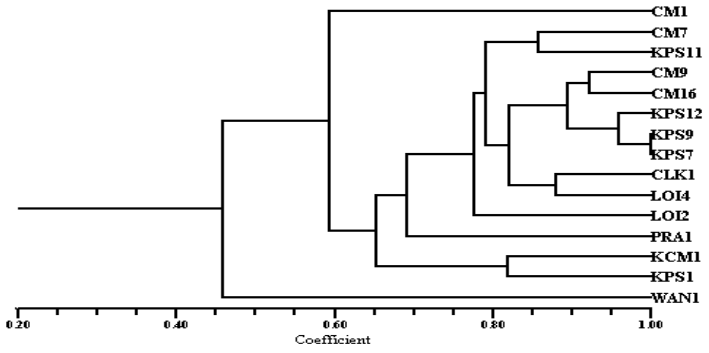
ตารางที่ 3 ลำดับเบสของสาย primer ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสนิม 15 สายพันธุ์และให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน

primer	ลำดับเบส	จำนวนแถบที่เพิ่มปริมาณได้	จำนวนแถบที่แสดงลักษณะแตกต่างกัน
UBC* 6	CCT GGG TTC C	10	8
UBC 18	GGG CCG TTT A	7	5
UBC 83	GGG CTC GTG G	7	5
UBC 84	GGG CGC GAG T	7	7
UBC 95	GGG GGG TTG G	6	4

* UBC = University of British Columbia

3. การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

การใช้ Primer ชนิด 10 base จำนวน 5 สาย จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมถั่วเหลือง 15 ตัวอย่าง ได้แถบดีเอ็นเอ 37 แถบ เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรม NTSYS ที่ใช้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 29 แถบ สามารถจัดกลุ่มเชื้อราสนิมออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้ โดยเชื้อราสนิมที่ได้จากจังหวัดนครปฐม (KPS)มีความใกล้ชิดกัน เชื้อราสนิมจากจังหวัดเชียงใหม่บางตัวอย่างมีความใกล้ชิดกันและบางตัวอย่างมีความแตกต่างกัน เหตุที่เชื้อราสนิมจัดกลุ่มได้แต่ไม่มีความสัมพันธ์กันในพื้นที่เก็บตัวอย่าง เนื่องจากเชื้อราสนิมมีความหลากหลายในท้องที่ต่าง ๆ สูง



ภาพที่ 1 แสดงการจัดกลุ่มสายพันธุ์เชื้อราสนิมถั่วเหลืองด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD โดยใช้ primer UBC 6 UBC 18 UBC 83 UBC 84 UBC 95 และคำนวณด้วยโปรแกรม NTSYS

การทดลองที่ 2 การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์เชื้อราสนิมด้วยลำดับเบส

1. การเตรียมเชื้อราสนิม

เชื้อราสนิมที่ใช้ในการทดลองจำนวน 7 ตัวอย่างซึ่งเป็นตัวอย่างจาก ประเทศไทย 2 ตัวอย่าง ออสเตรเลีย ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ บราซิลและ เปอร์โตริโก ประเทศละ 1 ตัวอย่าง นำสปอร์ของเชื้อราสนิมซึ่งเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที

นำสปอร์ โรยลงบนภาชนะใสน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปิดภาชนะ วางไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 – 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สปอร์จะงอกเป็นเส้นใยของเชื้อราลอยอยู่บนผิวน้ำ ใช้เข็มเขี่ยลอกแผ่นของเส้นใยวางลงบนกระดาษกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ซับน้ำจนแห้งสนิท

2 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

ใช้วิธีการสกัดของ NucleoSpin โดยนำเส้นใยของเชื้อราน้ำหนักประมาณ 50 ไมโครกรัมใส่ลงในหลอดสกัด

เติมไนโตรเจนเหลวลงในหลอดสกัด ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เพื่อให้เส้นใยแข็ง

นำแท่งพลาสติกสำหรับบดตัวอย่าง บดเส้นใยในหลอดสกัดให้ป่นเป็นผงละเอียด

เติม extraction buffer จำนวน 300 ไมโครลิตร และ RNase 20 ไมโครลิตร บ่ม ณ อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที

นำหลอดสกัดไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 10 นาที

แยกส่วนที่เป็นของเหลวออก ใส่หลอดสกัดหลอดใหม่

เติมสารละลายทำความสะอาดดีเอ็นเอลงไป 300 ไมโครลิตร และแอลกอฮอร์ 95% จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบา ๆ เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้สารละลายรวมตัวกัน

ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอดที่มีแผ่นกรอง (NucleoSpin column)

นำหลอดนี้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา นาน 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง

ดูดสารละลายทำความสะอาดดีเอ็นเอ 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด NucleoSpin column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลานาน 1 นาที

ปฏิบัติเช่นนี้อีก 1 ครั้ง

ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer

นำไปตรวจคุณภาพด้วยวิธีการผ่านกระไฟฟ้าเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3. การโคลนนิ่ง นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณด้วย primer ITS4/ITS5 ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรม ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เปิดเครื่องที่	อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน	30 วินาที
ขั้นตอนที่ 2 การแยกสายดีเอ็นเอที่	อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน	30 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 primer เกาะสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นตอนที่ 4 การต่อสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

(ปฏิบัติขั้นตอนที่ 2 - 4 จำนวน 40 รอบ)

ขั้นตอนที่ 5 หยุดปฏิกิริยา ที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ขั้นตอนที่ 6 การพักปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานจนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปวัดความเข้มข้นด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานบนแผ่นวุ้น โดยปรับความเข้มข้นให้เป็น 10-20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

นำดีแอ็นเอที่ปรับความเข้มข้นนี้ไปโคลนด้วย พลาสมิด pCR-TOPO vector (บริษัทไบโอจีโนเมต จำกัด) โดยสอดพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร LB ที่ผสม ampicillin, X-GAL และ IPTG

บ่มจานเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. การสกัดพลาสมิด

ใช้ไม้จิ้มฟันที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะบนโคโลนีที่เลือกไว้ โดยเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวหรือสีฟ้าอ่อน

แตะไม้จิ้มฟันลงบนอาหารแข็ง LB ในจานเลี้ยงเชื้อ และใส่ไม้จิ้มฟันลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 10 มิลลิลิตร

จานเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นำหลอดอาหารไปวางบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำแบคทีเรียในหลอดอาหารไปหมุนเหวี่ยง โดยดูดอาหารเหลว 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดพลาสติก หมุนเหวี่ยงท ีีด่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 1 นาที ใช้สายดูดความดันดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไป ดูดอาหารที่มีเชื้อแบคทีเรียมาอีก 1.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงเช่นเดียวกัน ดูดสารละลายอาหารออกให้หมด จะพบตะกอนแบคทีเรียก้นหลอด ดูดสารละลายเซลล์ 200 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดสกัด เขย่าให้สารละลายละลายเซลล์แบคทีเรียให้ทั่วกัน ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ใช้สำหรับสกัดพลาสมิด 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดสกัด เขย่าสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 5 นาที เติมสารละลายปรับสภาพลงไป 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวด้านบนใส่ลงในหลอดอันใหม่ที่ใส่สารจับดีเอ็นเอ (rasin) ไว้แล้ว ใช้เครื่องดูดลม ดูดสารละลายผ่านสารจับดีเอ็นเอ ให้จับพลาสมิดไว้ รอจนสารละลายไหลผ่านไปหมด ปล่อยให้เครื่องดูดลมทำงานต่ออีก 30 วินาที จึงถอดหลอดออกจากเครื่องดูดความดัน ใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงในหลอดจำนวน 50 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาทีเป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายพลาสมิดที่ได้ไปตรวจหาความเข้มข้นด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านแผ่นวุ้น เปรียบเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน

5. **การตรวจลำดับเบส**

โดยใช้สารเคมีต่าง ๆ ตามวิธีการของ Big Dye (บริษัท Pergin-Elmer) ซึ่งใช้ร่วมกับเครื่องตรวจลำดับเบส ABI Prism Sequencer

นำพลาสมิดที่สกัดได้ที่มีความเข้มข้น 750 นาโนกรัม เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ primer ITS4/ITS5 เป็น reverse และ forward primers ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เปิดเครื่องที่ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 2 การแยกสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 primer เกาะสายดีเอ็นเอ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 การต่อสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 4 นาที

(ปฏิบัติขั้นตอน 2 – 4 จำนวน 25 รอบ)

ขั้นตอนที่ 5 การพักปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานจนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปผ่านผงกรอง sephadex ก่อนนำไปตรวจลำดับเบสด้วยเครื่องมือ ABI Prism Sequencer PE 310

6. **การบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล**

เมื่อได้ข้อมูลการตรวจลำดับเบสโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากการใช้ primers ทั้ง 2 ชนิด ทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราสนิมทั้ง 2 สาย (สาย reverse และ forward) เข้าด้วยกันเพื่อให้เกิดข้อมูลที่สมบูรณ์ นำข้อมูลลำดับเบสของเชื้อราทั้ง 7 สายพันธุ์ไปเปรียบเทียบกัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง ตุลาคม 2543 ถึง กันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ARC/ Foreign Diseases –Weed Science Research, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA

ผลและวิจารณ์การทดลอง

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณส่วนของ ITS4 และ ITS5 โดยวิธีการของ Wizard DNA Clean-up System (Promega Corp.) โดยการใช้เครื่องตรวจลำดับเบสอัตโนมัติ ABI PE 310 Prism Sequencer ได้ผลลำดับเบสจำนวน 300 - 400 เบส ลำดับเบสของเชื้อราสนิมจากประเทศไทย 2 ตัวอย่าง (THO1-15 และ Thailand) ออสเตรเลีย (Australia 79-1) ไต้หวัน (Taiwan 72-1) และฟิลิปปินส์ (Philippines) มีความเหมือนกันมากกว่า 99 % ส่วนเชื้อราสนิมจาก เปอร์โตริโก และบราซิล มีลำดับเบสเหมือนกันมากกว่า 99 % ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม นี้ได้มีการจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาไว้ว่าเป็น *Phakopsora pachyrhizi* และ *Phakopsora meibomiae* ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของเชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีความเหมือนกันมากกว่า 93 % (ภาพที่ 1) การใช้ลักษณะของ RB และ Tan Type จากการตอบสนองของพืชจากเชื้อรา *Phakopsora pachyrhizi* และ *Phakopsora meibomiae* ควรพบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์ลำดับเบสมากกว่านี้ อย่างไรก็ตามลำดับเบสดังกล่าวอาจอยู่บนโครโมโซมส่วนอื่นที่ไม่เป็นคู่สมของ primer ของ ITS4 และ ITS5 ที่ใช้เป็น primer ต้นสาย

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสบนดีเอ็นเอของเชื้อราสนิมที่ได้จากประเทศต่าง ๆ เมื่อใช้ ITS 4 และ ITS 5 เพิ่มประมาณดีเอ็นเอจากส่วนของ Ribosomal DNA

TH-01-15	51	ATTAATAAAA AGCT- - - - AA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
Australia	51	ATTAATAAAA AGCT- - - - AA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
Taiwan 72	51	ATTAATAAAA AGCT- - - - AA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
Thailand 77	51	ATTAATAAAA AGCT- - - - AA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
Philippines	51	ATTAATAAAA AGCT- - - - AA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
Puerto Rico	51	ATTAATAAAA AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
Brazil 82-1	51	ATTAATAAAA AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TTATTGTGGC TCAAACT--
TH-01-15	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC T- - - - - - -CA AAGTCAAATA GAATGTTTTA
Australia	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC T- - - - - - -CA AAGTCAAATA GAATGTTTTA
Taiwan 72	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC T- - - - - - -CA AAGTCAAATA GAATGTTTTA
Thailand 77	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC T- - - - - - -CA AAGTCAAATA GAATGTTTTA
Philippines	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC T- - - - - - -CA AAGTCAAATA GAATGTTTTA
Puerto Rico	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC TAAATAACCA AAGTCAAATA GAATGTTTTA
Brazil 82-1	189	ATAATCTTTT TTTTTT - AAC TAAATAACCA AAGTCAAATA GAATGTTTTA

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อราสนิมของถั่วเหลืองโดยใช้ primer 5 สาย ได้แก่ UBC 6, UBC 18, UBC 83, UBC84 และ UBC 95 สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของเชื้อราสนิมได้ โดยพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถจัดกลุ่มเชื้อราสนิมออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ เชื้อราสนิมจากจังหวัดนครปฐม (KPS) มีความใกล้ชิดกัน เชื้อราสนิมจากจังหวัดเชียงใหม่บางตัวอย่างมีความใกล้ชิดกันและบางตัวอย่างมีความแตกต่างกัน เหตุที่เชื้อราสนิมจัดกลุ่มได้แต่ไม่มีความสัมพันธ์กันในพื้นที่เก็บตัวอย่าง เนื่องจากเชื้อราสนิมมีความหลากหลายในท้องที่ต่าง ๆ สูง

การใช้ลำดับเบสจากดีเอ็นเอในส่วน ribosomalDNA ของเชื้อราสนิมสายพันธุ์จากประเทศต่าง ๆ พบว่าเชื้อราสนิมของถั่วเหลืองจากประเทศไทย (THO1-15 และ Thailand) ออสเตรเลีย (Australia 79-1) ไต้หวัน และฟิลลิปปินส์ มีลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน ITS4 และ ITS5 ที่เหมือนกันมากกว่า 99 % และลำดับเบสของเชื้อราสนิมสายพันธุ์จากเปอโตริโก (Puerto Rico)และบราซิล (Brazil 82-1) มีความเหมือนกันมากกว่า 99 % โดยเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มมีลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอยู่ 93 %

เอกสารอ้างอิง

Asian Vegetable Research and Development Center (AVRDC) 1977. Soybean AVRDC Progress Report. 1975 : 18-24.

Bromfield, K.R. 1981. Differential reaction of some soybean accessions to *Phaskopsora pachyrhizi*. Soybean Rust Newsletter 4:2.

Bromfield, K.R. and E.E. Hartwig. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. Crop Sci. 20:254-255.

Hartwig, E.E. 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. Crop Sci. 26:1135-1136.

Hartwig, E.E. and K.R. Bromfield. 1983. Relationship between three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. Crop Sci. 23:237-239

McLean,R.J. and D.E. Byth. 1980. Inheritance of resistance to rust *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. Aust. J. Agri. Res. 31:951- 956

Melching, J.S., K.R. Bromfield and C.H. Kingsolver.1979. Infection,colonization and uredospore production on Wayne soybean by four cultures of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal of soybean rust. Phytopathology 69:1262-1265.

Poonpolgul, S and A.T. Tschanz. 1984. III. Physiological races of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*). Report of Research Intern. AVRDC, Shanhua, Taiwan,Jan.9,1983-Jan.91984.

Poonpolgul, S and P.Surin. 1985. Physiological races of soybean rust in Thailand. Thai Phytopathology Society J. 5:114-119. (In Thai, Eng. abst.)

Poonpolgul, S 1997. Physiological races of soybean rust fungus, *Phakopsora pachyrhizi* H.& P. Syd.,and inheritance of the resistance in soybean. Ph.D.Thesis, Kasetsart Unv. Bangkok, Thailand. (In English,Thai abst.)

Sinclair, J.B. (ed.) 1982. Compendium of Soybean Disease. American Phytopath. Soc. Proc., St.Paul, Minn. 104 p.

Sangawongse, P. 1973. A preliminary report of study on soybean rust. Thai J. of Agri. Sci. 6:165-169. (In Thai, Eng. abst.)

Tschanz, A.T. and M.C. Tsai. 1983. Evidence of tolerance to soybean rust in soybean. Soybean Rust Newsletter 6:28-31.

การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phythophthora spp* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

DNA Fingerprinting of *Phythophthora spp.*, Causal Agent of Root and Stem Rot Diseases.

ศรีสุข พูนผลกุล **ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์**

กลุ่มวิจัยโรคพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Phythophthora spp* จำนวน 24 ตัวอย่างจากพืช 12 ชนิด ได้แก่ ทุเรียน พริกไทย ลางสาด ลองกอง เผือก ส้มเขียวหวาน กล้วยไม้ ต้นแพงพวย ละหุ่ง หน้าวัว และ วานิลลา และเชื้อราที่แยกได้จากน้ำในสวนส้มเขียวหวานอีก 1 ตัวอย่าง รวมเป็น 25 ตัวอย่าง แยกเชื้อบริสุทธิ์ เพิ่มปริมาณบนอาหาร V 8 blot และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Murray and Thompson (1980) จำแนกและจัดกลุ่มเชื้อราด้วยเทคนิค Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) โดยคัดเลือก primer ที่เหมาะสมที่เพิ่มปริมาณและได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ primer ที่คัดเลือกได้คือ UBC 155 UBC 811 UBC 818 UBC 825 UBC 827 UBC 862 และ UBC 873 และสามารถจำแนกเชื้อรา *Phythophthora spp.* ได้ดี โดยสามารถจัดกลุ่มเชื้อราที่ได้จากทุเรียนไว้ในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มเชื้อราจาก หน้าวัว ละหุ่งกล้วยไม้ ส้มเขียวหวานและ พริกไทย กลุ่มเชื้อราจาก ลองกอง ลางสาด และ วานิลลา สำหรับเชื้อราจากเผือก และ ต้นแพงพวย ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อราที่ได้จากพืชอื่น ๆ อย่างมาก ส่วนเชื้อราจากน้ำในสวนส้มเขียวหวานมีความใกล้ชิดกับเชื้อราที่แยกจากต้นส้มเขียวหวานมาก

การใช้เทคนิค Amplification Fragment Length Polymorphic (AFLP) ในการจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อรา *Phythophthora spp* ที่ได้จาก ทุเรียน พริกไทย ส้ม และหน้าวัว จำนวน 9 ตัวอย่าง ด้วยการเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ พบว่า เอ็นไซม์ EcoRI + AGT + Ned ให้ผลในการจำแนกและจัดกลุ่มเชื้อรา *Phythophthora spp* ที่ได้จาก ทุเรียนไว้ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนเชื้อราจากพริกไทยและหน้าวัว ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันแยกจากลายพิมพ์ของส้มเขียวหวาน อย่าง ชัดเจน

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 75-204-005รหัส

Abstract

Using 6 microsatelite primers from a set of University of British Columbia No. 811,827,861,862, 864 and 866, a total of 68 reproducible polymorphic bands were generated across 28 fungal isolates. Four main groups of clusters were identified at the similarity scale of 0.02. Four *Phytophthora parasitica* isolated from black pepper were in the first group together with isolates from anthrurium, castor bean, tangarine, orchid and a fungus isolated from water. Two isolates of *P. colocasiae* from taro also in this group at 0.2 similarity. *P. palmivora* isolated from vanilla, tangarine, longong,langsad, mangosteen and 4 isolates of durian were fell into the third group. Another 5 isolates from durian were fell into the forth group and showed similarity from 0.3 to 0.5. Isolate from periwinkle was out ofthe groups suggested that this isolate may not be *Phytophthora* sp. The primer set can distinguish isolates of *Phytophthora parasitica* from *P. palmivora*

The Amplification Fragment Length Polymorphic DNA (AFLP) technique was used to compare and classify 9 isolates of *Phytophthora* spp. from durian, pepper, tangerine, and anthrurium. The restricted enzyme, EcoRI +AGT+Ned has potency in grouping durians *Phytophthora* spp. isolates in a group, pepper and anthrurium *Phytophthora* spp. in another group different from *Phytophthora* sp. from tangerine.

คำนำ

เชื้อรา ***Phythophthora spp*** เป็นสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ทุเรียน ลองกอง กล้วยไม้ พริกไทย มังคุด ส้มเขียวหวาน เผือก หน้าวัว เป็นต้น (พัฒนาและคณะ, 25 และ วิเชียร , 25) นอกจากนี้ยังพบอาศัยในพืชอื่น ๆ ทั่วไปในธรรมชาติ การจำแนกสายพันธุ์อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา ซึ่งสภาพแวดล้อมมีผลกระทบ ต่อการจำแนก ทำให้ลักษณะที่ปรากฏนั้นมีความผันแปรไป ดังนั้นการใช้เทคนิคด้านดีเอ็นเอ เช่น RAPD และ AFLP เพื่อทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา ซึ่งเป็นการจำแนกสายพันธุ์โดยตรงถึงระดับโมเลกุล จะมีความ แม่นยำและง่ายต่อการปฏิบัติ ทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดและความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราจากพืชอาศัยต่างๆของแต่ละสายพันธุ์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เทคนิคนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา และการศึกษาขั้นสูงต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สายพันธุ์เชื้อรา *Phythophthora spp* จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ

สารเคมีในการสกัด การเพิ่มปริมาณและการตรวจหาดีเอ็นเอ

เอ็นไซม์ที่ใช้ในการตัดสายและเชื่อมสายดีเอ็นเอ

อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ

วิธีการ

การทดลองที่ 1. การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD

1.1 การรวบรวมเชื้อราและแยกเชื้อบริสุทธิ์

รวบรวมเชื้อรา *Phythophthora spp* จากพืชชนิดต่าง ๆ จำนวน 25 ตัวอย่าง ได้แก่ ทุเรียน 9 ตัวอย่าง พริกไทย 4 ตัวอย่าง ลางสาด ลองกอง เผือก และ ส้มเขียวหวาน ชนิดละ 2 ตัวอย่าง กล้วยไม้ ต้นแพงพวย มังคุด ละหุ่ง วานิลา และหน้าวัว ชนิดละ 1 ตัวอย่าง จาก แหล่งปลูกพืชที่พบการระบาดของโรค ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และเพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อราโดยการเลี้ยงบนอาหารเหลว V-8 blot (ประกอบด้วย V-8 juice, sucrose, yeast extract, PCNB, rifampicin, hymexazol) เป็นเวลา 7 วัน กรองเส้นใย และล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำหลาย ๆ ครั้ง และผึ่งเส้นใยให้แห้ง นำไปเก็บไว้ในตู้เก็บอุณหภูมิต่ำ

1.2 การสกัดและแยกดีเอ็นแอบริสุทธิ์

ด้วยวิธีการของ Murray โดยใช้ CTAB buffer และ mercaptoethanol เป็นสารสกัด และทำให้ตกตะกอนด้วย ethyl alcohol 70%

ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ที่ 50 ng/µl

1.3 การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ

โดยใช้ primer ชนิด 10 base และ microsattlite primer รวม 76 primer (University of British Columbia)

สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต่อ 1 การทดลอง

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	.5	µl
10X PCR buffer with 15 mM $MgCl_2$	40	µl
dNTP (1.25 mM)		µl
Amplification Taq	0.33	µl
DNA template	2.0	µl
Primer		µl

ได้สารละลายรวม 25 µl

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยการใช้เครื่องเพิ่มปริมาณอัตโนมัติ (Gene Amp PCR System PE 9700) และใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เปิดและอุ่นเครื่องที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ขั้นตอนที่ 2 การแยกสายดีเอ็นเอ ที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นตอนที่ 3 primer เกาะสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นตอนที่ 4 การต่อสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

(ปฏิบัติขั้นตอน 2 - 4 รวม 40 รอบ)

ขั้นตอนที่ 5 การหยุดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ขั้นตอนที่ 6 การพักปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานจนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ

ทำการตรวจผลผลิตสายดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์โดยเทคนิค agarose gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้นของ agarose 1% ในสารละลาย TAE buffer โดยย้อมสี gel ด้วย ethedium bromide และถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ

เปรียบเทียบผลของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS.PC เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง ตุลาคม 2543 ถึง กันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

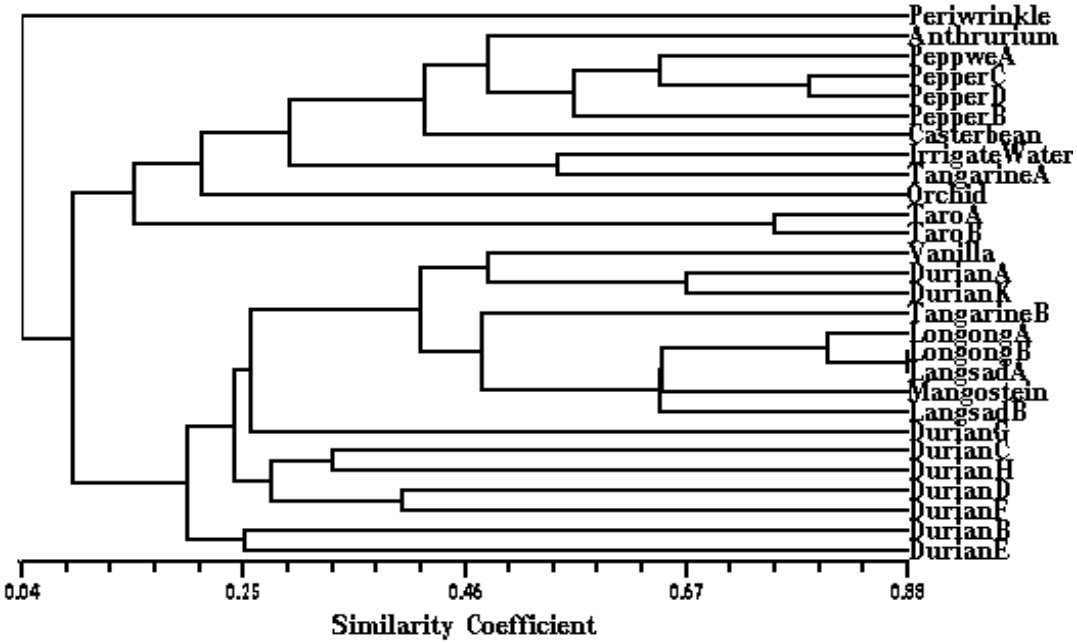
การใช้ primer จำนวน 76 ชนิด มีเพียง 31 ชนิด ที่ให้ผลในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ primer จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ UBC 155 UBC 811 UBC 818 UBC 825 UBC 827 UBC 862 และ UBC 873 ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างเชื้อราไอโซเลทต่าง ๆ (ตารางที่ 1) เมื่อคำนวณด้วยโปรแกรม NTSYS โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของจำนวน 53 แถบ ทำให้จัดกลุ่มเชื้อรา *Phythophthora* spp ได้ โดยสามารถจัดกลุ่มเชื้อราที่ได้จากทุเรียนไว้ในกลุ่มเดียวกัน กลุ่มเชื้อราจาก หน้าวัว กล้วยไม้ ละหุ่ง ส้มเขียวหวาน เชื้อราจากน้ำในสวนส้มเขียวหวาน และ

พริกไทย กลุ่มเชื้อราจาก ลองกอง ลางสาด และ วานิลลา สำหรับเชื้อราจากเผือก และ ต้นแพงพวย ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ เนื่องจากมีความแตกต่างจากเชื้อราที่ได้จากพืชอื่น ๆ อย่างมาก (ภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของ primer และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ primer เพิ่มปริมาณได้

primer	ลำดับเบส	แถบดีเอ็นเอ ที่ได้	แถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่าง
UBC* 155	**CTG GCG GCT G**	**12**	**12**
UBC 811	**GAG AGA GAG AGA GAG AC**	**4**	**4**
UBC 818	**CAC ACA CAC ACA CAC AG**	**8**	**7**
UBC 825	**ACA CAC ACA CAC ACA CT**	**5**	**4**
UBC 827	**ACA CAC ACA CAC ACA CG**	**10**	**9**
UBC 862	**AGC AGC AGC AGC AGC AGC**	**10**	**10**
UBC 873	**GAC AGA CAG ACA GAC A**	**9**	**7**

* UBC = University of British Columbia



ภาพที่ 1 แสดงผลของการจัดกลุ่มเชื้อรา *Phythophthora* spp จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD ด้วย primer 7 ชนิด และคำนวณด้วยโปรแกรม NTSYS โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน

การทดลองที่ 2. การจำแนกเชื้อรา *Phythophthora* spp จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Phythophthora* spp จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ ทุเรียน 6 ตัวอย่าง หน้าวัว ส้ม พริกไทย อย่างละ 1 ตัวอย่าง
2. เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ MseI
3. เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ต่อสาย primer และสีย้อม
4. สารเคมีในการสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สารเคมีในการตรวจสอบดีเอ็นเอ

วิธีการทดลอง

1. วิธีการสกัดและแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1
2. การตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes)
   - นำสายดีเอ็นเอที่สกัดไว้ ไปปรับความเข้มข้นให้เป็น 500 ng/µl
   - เตรียมสารละลายที่ใช้ตัดสายดีเอ็นเอ (Restriction digest cocktail) ดังนี้

   <u>สารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง 1 ตัวอย่าง</u> ประกอบด้วย

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0.65 µl
10 X T4 DNA ligase buffer with 10mM ATP	1.1 µl
0.5 M NaCl	1.1 µl
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA) Z1mg/ml)	0.55 µl
MseI (20,000 U/ml)	0.05 µl
EcoRI (100,000 U/ml)	0.05 µl
สารละลายรวม	3.5 µl

   - เติม ดีเอ็นเอ ความเข้มข้น 500 ng/µl จำนวน 5.5 ng/µl ในสารละลายที่ใช้ตัดสายดีเอ็นเอ ได้ปริมาตรรวม 9 ng/µl
   - นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เอ็นไซม์ไปตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะตามที่ต้องการ
   - นำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
   - เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส
2. การต่อสายดีเอ็นเอกับเอ็นไซม์ตัวเชื่อม (Ligation)
   - นำเอ็นไซม์ตัวเชื่อม (adaptor pair) จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ EcoRI adaptor pair และ MseI adaptor pair ไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้ววางไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
   - เตรียมสารละลายใช้ต่อสายดีเอ็นเอกับเอ็นไซม์ตัวเชื่อม (ligase cocktail) ดังนี้

สารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง 1 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	0.717	µl
10 X T4 DNA ligase buffer with 10mM ATP	0.1	µl
0.5 M NaCl	0.1	µl
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA) (1mg/ml)	0.05	µl
High Conc. T4 ligase (2,000,000 U/ml)	0.033	µl
MseI adaptor pair (5 µM)	1.0	µl
EcoRI adaptor pair (5 µM)	1.0	µl
ได้สารละลายรวม	3.0	µl

นำสารละลายที่เตรียมได้ ใส่รวมลงในหลอดดีเอ็นเอที่ถูกตัดสายไว้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (ในข้อ 2)

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เอ็นไซม์ตัวเชื่อมต่อเข้ากับชิ้นดีเอ็นเอในหลอดทดลอง

เติมสารละลาย $TE_{0.1}$ จำนวน 88 µl ลงในหลอดทดลอง

3. การเตรียมสารละลายสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (AFLP core mix)

สารละลายสำหรับใช้ในการทดลอง 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วย

10X PCR buffer with 15 mM $MgCl_2$	40	µl
dNTP (1.25 mM)	32	µl
Amplification Taq	2.5	µl
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	225.5	µl
ได้สารละลายรวม	16.0	µl

ใช้สารละลายนี้จำนวน 15 µl ต่อ 1 การทดลอง

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขั้นที่ 1 (Pre Amplification)

นำสารละลาย AFLP core mix (15 µl) , MseI + C (0.5 µl) และ EcoRI + A (0.5 µl) ใส่ลงในหลอดทดลอง

นำดีเอ็นเอที่ถูกตัดและเชื่อมกับเอ็นไซม์ตัวเชื่อม (จากข้อ 3) จำนวน 4 µl ใส่รวมกันแล้ว นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Gene Amp PCR System PE 9700) โดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เปิดและอุ่นเครื่องที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ขั้นตอนที่ 2 การแยกสายดีเอ็นเอ ที่ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 primer เกาะสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 การต่อสายดีเอ็นเอที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

(ปฏิบัติขั้นตอน 2 - 4 รวม 20 รอบ)

ขั้นตอนที่ 5 การหยุดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ขั้นตอนที่ 6 การพักปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานจนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ

เติมสารละลาย $TE_{0.1}$ จำนวน 380 µl ลงในหลอดทดลอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขั้นที่ 2

<u>สารละลายใช้สำหรับการทดลอง 1 ตัวอย่าง</u> ประกอบด้วย

AFLP core mix	15 µl
MseI +C	1.0 µl
EcoRI +2/3 base.+ Dye	1. 2 µl

เอ็นไซม์ EcoRI +2/3 base.+ Dye ที่ใช้ในการคัดเลือกได้แก่

EcoRI + A + NED	EcoRI +ACA + FAM
EcoRI + AT +FAM	EcoRI +ACC + FAM
EcoRI +AG + HEX	EcoRI + ACG +FAM
EcoRI + AA + HEX	EcoRI + AGC + NED
EcoRI + AC + NED	EcoRI + AGG +NED
EcoRI +ATA +FAM	EcoRI +AGA + HEX
EcoRI +ACT +FAM	EcoRI +GTA + FAM
EcoRI + AGT + NED	

Dye ที่ใช้สำหรับเป็นตัว marker จะแสดงสีในโปรแกรมดังนี้

FAM ได้แถบสีน้ำเงิน NED ได้แถบสีเหลือง HEX ได้แถบสีเขียว

- นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากขั้นที่ 1 จำนวน 3 µl ใส่ลงในสารละลายหลอดทดลอง
- นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณอัตโนมัติ ด้วยโปรแกรมลดระดับอุณหภูมิดังนี้

อุณหภูมิเปิดเครื่อง	อุณหภูมิของเครื่องต่อสายดีเอ็นเออัตโนมัติแต่ละรอบ			จำนวนรอบ
	อุณหภูมิตั้งต้น	อุณหภูมิแยกสายดีเอ็นเอ	อุณหภูมิต่อสายดีเอ็นเอ	
94C 2 min	94 C 20 sec	66 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	65 C 30 sec	72 C 2 min	1
--	94 C 20 sec	64 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	63 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	62 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	61 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	60 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	59 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	58 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	66 C 30 sec	72 C 2 min	1
-	94 C 20 sec	56 C 30 sec	72 C 2 min	20
60 C 30 min	-	-	-	1
4 C forever	-	-	-	1

- อุณหภูมิใช้ในการเปิดเครื่องที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แต่ละรอบที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตั้งอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที การแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที การต่อสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ และรอบต่อไปปรับอุณหภูมิในการต่อสายดีเอ็นเอลดลงจากอุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส รอบละ 1 องศาเซลเซียส จำนวน 11 รอบ ซึ่งจะเหลืออุณหภูมิในการต่อสายดีเอ็นเอ 56 องศาเซลเซียส

- ต่อจากนั้นจะเพิ่มสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส อีก 19 รอบ

- เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการ พักเครื่องที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนปรับเป็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำหลอดทดลองออกจากเครื่องมือ

- นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส หรือนำไปอ่านแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องอ่านแถบดีเอ็นเออัตโนมัติ ABI Prism 310 Genetic Analyzer

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง ตุลาคม 2543 ถึง กันยายน 2546

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
ARC/ Foreign Diseases –Weed Science Research,
Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA

ผลการทดลอง

การคัดเลือกประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ EcoRI +2/3 base.+ Dye พบว่า เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI + AT +FAM, EcoRI +ATA +FAM, EcoRI +ACT +FAM, EcoRI + AGT + NED, EcoRI+AGC+Ned และ EcoRI +AGA + HEX สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ค่าแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้ เมื่อทดสอบความสม่ำเสมอในการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอให้คงที่อย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อแสดงว่าเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพดี ผลการทดลองสรุปได้ว่า เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI+AGT+Ned, EcoRI+AGA+Hex และ EcoRI+AGC+Ned มีประสิทธิภาพในการใช้จัดกลุ่มเชื้อราได้ ซึ่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI+AGT+Ned มีประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มดีที่สุด โดยจัดกลุ่มเชื้อรา *Phytophthora* spp. จากทุเรียนอยู่ในกลุ่มเดียวกัน มีความใกล้ชิดกันตั้งแต่ 75 – 100 % เชื้อรา *Phytophthora* spp.จากหน้าวัวและพริกไทยอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เชื้อราจากหน้าวัวและพริกไทยมีความใกล้ชิดกัน 90% และใกล้ชิดกับเชื้อราจากส้มเขียวหวาน 80 % ซึ่งถูกจัดไว้ในกลุ่มที่ 3

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์การทดลอง

การจำแนกเชื้อรา *Phytophthora* spp. จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD และเทคนิค AFLP ให้ผลในการจำแนกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลของ primer ที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD จำนวน 7 primer ได้แก่ UBC 155 UBC 811 UBC 818 UBC 825 UBC 827 UBC 862 และ UBC 873 ใช้จัดกลุ่มเชื้อรา ออกได้ 3 กลุ่ม คือกลุ่มเชื้อราจากทุเรียน และ หน้าวัว กลุ่มเชื้อราจากพริกไทย ละหุ่ง กล้วยไม้ และส้มเขียวหวาน และกลุ่มเชื้อราจาก วานิลลา มังคุด ลองกองและลางสาด ส่วนเชื้อราจาก เผือก และ แพงพวยไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มได้ แสดงว่าเชื้อรา *Phytophthora* sp. จากเผือกและแพงพวยมีความแตกต่างในระดับโมเลกุลกับเชื้อรา *Phytophthora sp.* สาเหตุโรคไม้ผลอื่น ๆ

การจำแนกเชื้อรา *Phytophthora* sp.ที่แยกได้จาก ทุเรียน หน้าวัว พริกไทย และส้มเขียวหวาน จำนวน 9 ไอโซเลท โดยเทคนิค AFLP พบว่าเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI+AGT+Ned, มีประสิทธิภาพในการใช้จัดกลุ่มเชื้อราได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเชื้อราจากทุเรียน กลุ่มเชื้อราจาก หน้าวัวและพริกไทย และกลุ่มเชื้อราจากส้มเขียวหวาน

เทคนิค RAPD และ เทคนิค AFLP จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Phytophthora* spp. ได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แม้ว่าเทคนิค AFLP จะมีความแม่นยำมากกว่า แต่ค่าใช้จ่ายในการจัดทำสูงกว่า

เทคนิค RAPD ดังนั้นในการจำแนกเชื้อรา *Phytophthora* spp. สามารถใช้ primer 7 ชนิด จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและจำแนกชนิดของเชื้อรานี้ได้

เอกสารอ้างอิง

Pattana Sontirat, Pitakpaivan,P. Khamhangridthirong,T.,Choobamrung,W. and Kueprakone.U. 1994. Host Index of plant Diseases in Thailand, Plant Pathology and Microbiology Division, dept, of Agri, Bangkok, Thailand.

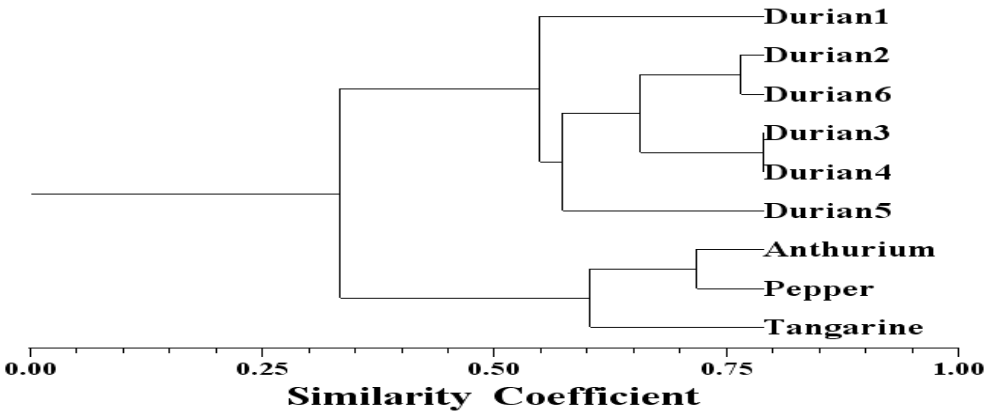
Wichian, G. 1984. Critrus diseases caused by fungi and bacteria. ; p. 20-42 *In* Journal of Pest : Diseases and Pests on *Citrus*. In Thailand. Thai Phytopathology Society , Bangkok, Thailand.

Panabieres F., Marais,A Trentin,F.Bonnet,P. and Ricci,P. ,1989. Repetitive DNA polymorphism analysis as a tool for identifying *Phytophthora* species. Phytopathology 79:1105-1109.

Suzui,T., Kueprakone,U and Kamhangridthirong,T. 1996. *Phytophthora* disease on some economic plant in Thailand. Plant Pathology and Microbiology Division, dept, of Agri, Bangkok, Thailand.

Waterhouse,G.M. 1963. The genus *Phytophthora* de bary. CMI Mycologia papers 92.22 pp.

ภาพที่ 2 แสดงผลของการจัดกลุ่มเชื้อรา *Phythophthora* spp จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก เทคนิค AFLP ด้วยเอ็นไซม์ตดจำเพาะ EcoRI+AGT+Ned และคำนวณด้วยโปรแกรม NTSYS โดยใช้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน



การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี้ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA

Monoclonal Antibody Production for detection of *Ralstonia solanacearum* Causal Bacterial Wilt of Potato and Develop to the Serology ELISA Test Kit.

วงศ์ บุญสืบสกุล

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร[1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รุ่งนภา คงสุวรรณ์

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

Ralstonia solanacearum (Yabuuchi *et al.*, 1995) สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและถูกจัดให้เป็นโรคพืชที่สำคัญมากที่สุดโรคหนึ่งของโลก ปัจจุบันเชื้อนี้ถูกจำแนกออกเป็น 5 race และ 5 biovar ตามความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อนี้ เป็นที่ยอมรับว่าการตรวจหาเชื้อนี้เพื่อการวินิจฉัยโรคที่ถูกต้องและรวดเร็วเป็นวิธีการที่เหมาะสมวิธีการหนึ่ง ในป้องกันกำจัดโรคนี้และวิธีการตรวจหาเชื้อทางเซรุ่มวิทยาก็เป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันมากวิธีหนึ่ง แต่ด้วยข้อจำกัดของ polyclonal antibody (Pab) ที่ไม่สามารถให้ความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอาศัยและ biovar ของเชื้อนี้ได้ ในการทดลองนี้ได้ผลิต monoclonal antibody (Mab) 22 โคน จากเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี Indirect ELISA กับเชื้อนี้ในพืชอาศัยอื่น ๆ 18 ชนิดครอบคลุม 3 ชนิด biovar ผลการทดสอบพบว่า Mab บางโคนที่ผลิตได้สามารถให้ปฏิกิริยาความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอาศัยและ biovar สูงและแตกต่างจาก Pab กล่าวคือพบว่า Mab ที่ผลิตได้ 3 โคน สามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา (strong reaction) สูงกว่า Pab เมื่อทดสอบกับเชื้อนี้ที่แยกจาก กระเพรา ยูคาลิปตัส และ มะเขือเปราะ , Mab 7 โคน สามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่มีความจำเพาะต่อ biovar 2 และ 4 สูงกว่า biovar 3 ของมันฝรั่ง, Mab 2 โคน สามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่มีความจำเพาะต่อ biovar 3 สูงกว่า biovar 2 และ 4 ของมันฝรั่ง, Mab 3 โคน ให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา (strong reaction) biovar 3 สูงกว่า biovar 4 กับเชื้อนี้ของ ขิง

รหัส 43 11 002 001

[1/] กลุ่มวิจัยพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์พืชและจุลินทรีย์ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปทุมมา และ ดาวเรือง ในขณะที่ทุกปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้น Pab ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ อย่างไรก็ดีในการศึกษานี้พบว่า Mab ส่วนใหญ่ที่ได้มีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาที่ไม่แตกต่างจาก Pab จากนั้นได้นำเอา Mab ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอาศัยและ biovar ของเชื้อนี้มาปรับใช้กับชุดตรวจสอบสำเร็จ (NCM ELISA test kit) ที่ใช้เพื่อการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ในมันฝรั่งโดยใช้แทน Pab ในชุดตรวจสอบดังกล่าว พบว่า Mab ที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ถึงระดับ biovar ของเชื้อนี้ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ Mab ที่เหมาะสมในการนำมาปรับใช้ในชุดตรวจสอบที่อัตราความเข้มข้นระหว่าง 1:5 ถึง 1: 25 ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด Mab ที่จะนำมาใช้

คำนำ

Ralstonia solanacearum (Yabuuchi *et al.*, 1995) ชื่อเดิม *Pseumonas solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด โรคนี้ถูกจัดให้เป็นโรคพืชที่สำคัญมากที่สุดโรคหนึ่งของโลก ในหลายปีที่ผ่านมานี้มีเอกสารที่ลงตีพิมพ์เป็นภาษาต่าง ๆ เกี่ยวกับเชื้อนี้มากกว่า 2000 ชิ้น ปัจจุบันมีรายงานว่ามีพืชที่เป็นโรคมากกว่า 200 ชนิด ใน 50 วงศ์ เช่น มันฝรั่ง , มะเขือเทศ, ยาสูบ, กล้วย, ถั่วลิสง, ขิง, มันเทศ, กล้วยประดับ, พริก , โคลเวอร์ , มะเขือยาว , หอมหัวใหญ่ , แตง , แรดิสส์ , มันสำปะหลัง , ทานตะวัน , ปักษาสวรรค์, เจอราเนี่ยม, มะละกอ , สตรอเบอร์รี่ , ปทุมมา, กระเพรา, ข่า, หม่อน , สะเดา, โอลีฟว์, ปาล์ม และวัชพืชหลายชนิด เป็นต้น (Hayward,1994) เนื่องจากมีพืชอาศัยกว้างขวางมาก ทำให้มีการจำแนกเพื่อจัดกลุ่มชนิดของเชื้อนี้หลายระบบแต่ที่ยอมรับและใช้เป็นมาตรฐานในขณะนี้คือระบบ race และ biovar ตามความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชอาศัยและคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อนี้ ซึ่งแบ่งเชื้อนี้ได้เป็น 5 race และ 5 biovar คือ race1 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้างขวาง ได้แก่ เชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในถั่วลิสง, ขิง , มะกอก, ยาสูบ, มันฝรั่ง, มะเขือเทศและกล้วย (2n) เป็นต้น, race2 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยเฉพาะในพืชตระกูลกล้วย (Musaceous) ได้แก่ กล้วยประดับเช่นพวก *Heliconia spp*. และ triploid banana (*Musa* AAA) race3 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยค่อนข้างจำกัดกับพืชพวกมันฝรั่งและมะเขือเทศ race4 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยเฉพาะในพืชพวกหม่อน และ race5 เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกับขิง (Buddenhagen *et al*., 1962; Pegg and Moffett, 1971; He *et al.*, 1983) สำหรับ 5 biovar ได้แก่ biovar 1 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcohol (mannitol, sorbitol, dulcitol) และ Disaccharide (maltose, lactose, cellobiose), biovar 2 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcohol แต่สร้างกรดในน้ำตาล Disaccharide, biovar 3 สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcoholและในน้ำตาล Disaccharide และ biovar 4 ไม่สร้างกรดในน้ำตาล Disaccharide แต่สร้างกรดในน้ำตาล Hexose alcohol (Hayward, 1964 และ 1991) มีรายงานว่าพบความแตกต่างในการสร้างกรดจากน้ำตาล Disaccharide ชนิด cellobiose ที่แตกต่างจาก biovar 4 และเสนอชื่อใหม่เป็น biovar 5 (He *et al.*, 1983) Buddenhagen (1985) ได้รายงานว่า race 3 ส่วนมากจะเป็น biovar 2 เท่านั้นและเชื้อนี้จะจำกัดพืชอาศัยเฉพาะกับมันฝรั่ง, มะเขือเทศ และมันฝรั่งพันธุ์พื้นเมืองที่พบในแถบเทือกเขาแอนเดียสในทวีปอเมริกาใต้เท่านั้น (Buddenhagen, 1985)

Palleroni and Doudoroff (1971) ได้รายงานว่า race1 ที่มีพืชอาศัยกว้างขวางส่วนมากจะพบว่าเป็น biovar 1,3 และ 4 เท่านั้น ขณะที่ race 2 จะมีแต่ biovar1 สำหรับการศึกษาทางเซรุ่มวิทยาเกี่ยวกับเชื้อนี้ Seal and Elphinstone (1994) ได้รายงานว่าการตรวจหาเชื้อนี้โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยามีประโยชน์อย่างมากกับงานทางด้านกักกันพืชเพราะสามารถตรวจหาเชื้อนี้ได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มีการนำเข้าและส่งออกทั้งที่ไม่ปรากฏอาการของโรคให้เห็นโดยสามารถใช้ได้ดีกับพืช มันฝรั่ง , มะเขือเทศ , ขิง และกล้วย ทั้งนี้ได้แสดงความคิดเห็นไว้ว่าสำหรับการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* นี้ต้องการข้อมูลในทางลึกเกี่ยวกับ การตรวจหาเชื้อที่ติดมากับพืชโดยที่ไม่แสดงอาการโรค (Latent infection) ด้วยแอนติบอดี้ที่มีความไวและความจำเพาะต่อเชื้อนี้สูงกว่านี้ (Harris, 1972) ควบคู่ไปกับการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น (Oi and Herzenberg, 1980) Kohler and Milstein (1975) รายงานว่า คุณสมบัติของ Pab มี immunoglobulin เป็น heterogeneous class เพราะ antigenic determinant เป็นแบบ multiple epitope ในขณะที่ Mab มี immunoglobulin เป็น monogeneous class เพราะ antigenic determinant เป็นแบบ single epitope ดังนั้น Mab จึงสามารถให้ปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงที่สูงกว่า Pab Macario and de Macario (1985) มีรายงานว่าจากการเปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของแอนติเจนที่เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ระหว่าง Mab และ Pab พบว่า Mab สามารถให้ปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงละเอียดกว่าและสูงกว่า Pab การศึกษานี้จะได้ทำการทดลองผลิต Mab จากเชื้อ *R. solanacearum* ของมันฝรั่งแล้วนำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี Indirect ELISAเปรียบเทียบกับ Pab ของเชื้อดังกล่าวในมันฝรั่งเช่นกัน โดยทดสอบกับเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในประเทศไทยครอบคลุม 18 พืชอาศัย, 2 ชนิด race และ 3 ชนิด biovar จากนั้นจะได้นำ Mab ที่ได้ไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ ELISA kit ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกจากพืชที่เป็นโรคเหี่ยว 18 ชนิด ได้แก่ หน้าวัว anthurium (*Anthurium andraeanum*), กระเพรา holy basil (*Ocimum sanctum*), พริกขี้หนู chili (*Capsicum mimimum*), ปทุมมา curcuma (*Curcuma alimatiforia*), มะเขือยาว eggplant (*Solanum melongena*), ยูคาลิปตัส eucalyptus (*Eucalyptus globutus*), ขิง ginger (*Zingiber officinale*), ถั่วลิสง groundnut (*Arachis hypogaea*), ดาวเรือง merigold (*African marigold*), พริกชี้ฟ้า pepper (*Capsicum annuum var. acuminatum*), พริกเหลือง pepper yellow (*Capsicum nigrum*), มันฝรั่ง potato (*Solanum tuberosum*), งา sesame (*Sesamum indicum*), ยาสูบ tobacco (*Nicotiana tabacum*), มะเขือเทศ tomato (*Lycopersicon esculentum*), มะเขือเปราะ tomato proa (*Lycopersicon annuum var.grossum*), ผักบุ้ง water convolvulus (*Ipomoea aquatica*) and วัชพืชหญ้ายาง maxican fireplant (*Euphorbia geniculata*)
2. เชื้อ *R. solanacearum* biovar 2, 3 และ 4 ที่แยกจากมันฝรั่งที่เป็นโรคเหี่ยว

3. กระต่ายสายพันธุ์แท้พันธุ์ New Zealand white อายุ 3 – 6 เดือน น้ำหนักตัวประมาณ 1.5 – 2 กก. หนูขาว Balb/c mice อายุ 1-2 เดือน

4. เครื่องมือสำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ, เข็มเขี่ยเชื้อ, ตะเกียง, หลอดทดลองธรรมดาและชนิดฝาเกลียว, จานอาหารเลี้ยงเชื้อ, แอลกอฮอลล์ 70 %, เครื่องกรองและกระดาษกรองเชื้อแบคทีเรีย กล้องสเตริโออินเวอร์เตด (Inverted stereo microscope) เป็นต้น

5. เครื่องมือสำหรับปฏิบัติการทางเซรุ่มวิทยา เช่น ไซริ้งขนาดต่าง ๆ , เข็มขนาดต่าง ๆ , Freund's incomplete adjuvant, Three-way mixture, กรงจับกระต่าย, อุปกรณ์และอาหารสำหรับกระต่ายและหนู, แอลกอฮอลล์เช็ดแผลฆ่าเชื้อ, สำลี, วาสลิน, ไซรินสำหรับขยายหลอดเลือด, มีดโกนผ่าตัด, บีกเกอร์แก้ว, กระดาษอลูมิน่ำ, กรรไกรและมีดโกนธรรมดา เป็นต้น

6. ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ เช่น 4^{o} และ 28^{o}-30^{o} ซ เป็นต้น

7. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuse), เครื่องเขย่าทั้งชนิด Vortex mixer และ Rotary shaker ที่สามารถปรับความเร็วรอบได้

8. เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ Hitachi 160.E สำหรับวัดความข้มขันของเชื้อแบคทีเรีย

9. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับทำ Indirect ELISA เช่น primary antiserum เป็น polyclonal antibody ที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *R.solanacearum* ที่เกิดโรคเหี่ยวกับมันฝรั่ง, ELISA reader, carbonate buffer, washing buffer ชนิด PBS-T, Miniwashing Danatech Laboratory Inc, ABC-kit (Avidin-biotinylated enzyme complex ของ Vector laboratory Inc., APH (Avidin conjugate with enzyme peroxidase complex dilute with hydrogenperoxide), สารที่ทำให้เกิดสี (substrate) ABTS (2,2-azino-di-3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate และ หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) เป็นต้น

10. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA, SMSA และ TTC (Triphenyltetrazolium chloride media) ซึ่งสามารถเตรียมจากมันฝรั่งและสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เช่น Peptone หรือ Polypeptone, $NH_4H_2PO_4$, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, Bromothymol blue วุ้นผง และอื่น ๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีอาหารสำหรับเลี้ยงเซล เช่น HAT media (Hypoxanthine aminopterin thymidine), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Istitute), DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) *และ* PEG (Poly ethylene glycol) เป็นต้น อาหารเหล่านี้มีขายสำเร็จรูป

11. เครื่องมือสำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียง หลอดทดลองธรรมดาและชนิดฝาเกลียว จานอาหารเลี้ยงเชื้อ แอลกอฮอล์ 70 % เครื่องกรองและกระดาษกรองเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

วิธีการ

<u>การผลิต Polyclonal antibody</u>

เชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง biovar 2, 3 และ4 ถูกเตรียมจากโคโลนีเดี่ยวที่เลี้ยงบนอาหาร TTC แต่ละเชื้อจะถูกนำมาล้างด้วยสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) 0.01 M pH. 7.2

ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปละลายเชื้อดังกล่าวแล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลแบคทีเรียด้วยเครื่องเซนตริฟิ้วที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทซุบเปอร์นาแต้นทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลด้วย PBS อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง ๆ สุดท้ายชั่งน้ำหนักของตะกอนเซลของแต่ละ biovar ให้เท่ากันแล้วละลายตะกอนเซลของทั้ง 3 biovar มารวมกันในสารละลาย PBS ปริมาตร 10 มล. แล้วบรรจุลงในถุง dialyse ที่แกว่งในสารละลาย 2 % glutaradehyde เป็นเวลา 3 ชม. เพื่อทำให้เซลตายและปรับสภาพเซลให้หมดความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลอง จากนั้นเปลี่ยนสารละลายเป็น PBS เพื่อล้าง glutaradehyde ออกให้หมดความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองเป็นเวลา 20 ชม. จากนั้นนำสารละลายเซลแบคทีเรียในถุงไดอะไลสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปรับความเข้มข้นของเซลที่ 10^9 cfu ต่อ มล.เพื่อฉีดเข้ากระต่ายที่อายุ 3 – 6 เดือน น้ำหนักตัวประมาณ 1.5 – 2 กก. โดยผสมสารละลายเซลกับ Freund's incomplete adjuvant ปริมาตร 1:1 (v/v) แล้วฉีดเข้ากระต่ายดังกล่าวปริมาตร 1 มล. 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน โดยการฉีดเข้า ใต้ผิวหนังบริเวณกล้ามเนื้อน่องขาหลังของกระต่ายทั้ง 2 ข้างสลับกัน หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายได้ 2 วัน ทำการเก็บเลือดทุกสัปดาห์จากเส้นเลือดหูของกระต่ายปริมาตร 2 มล, เพื่อนำมาทดสอบหาค่าความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นแอนติเจน (homologous antigen) ด้วยวิธี indirect ELISA และหาค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี้ โดยผลการทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อต้องเป็นบวกคือแอนติซีรัมในเลือดกระต่ายมีการสร้างแอนติบอดี้ที่มีปฏิกิริยาจำเพาะต่อแอนติเจนที่ใช้ฉีดเข้ากระต่าย สำหรับค่าไตเตอร์ถ้ายังต่ำอยู่ ก็ต้องฉีดเชื้อเข้ากระต่ายอีก 1-2 ครั้ง จนกว่าค่าไตเตอร์สูงพอ จึงทำการเก็บเลือดกระต่ายด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้นใส่ในบีกเกอร์ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วขนาด 100 มล. ให้ได้เลือดประมาณ 30 – 40 มล. ซึ่งขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของกระต่าย ปิดฝาบิกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ จากนั้นปล่อยให้เลือดกระต่ายแข็งตัว โดยวางบีกเกอร์บนโต๊ะที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 -2 ชม.แล้วแยกเลือดจากซีรัม (ของเหลวที่อยู่ในเลือด) ด้วยการใช้ปลายเข็มฉีดยาที่สะอาดเขี่ยเลือดที่เกาะติดผนังแก้วให้ก้อนเลือดลอยอยู่ในซีรัมแล้วเก็บข้ามคืนที่ 4° ซ. จากนั้นดูดเอาซีรัมออกจากก้อนเลือดด้วยพลาสเจอร์ไปเปทที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวก์แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ปนมา แล้วค่อย ๆ ดูดเอาซีรัมอย่าให้มีเม็ดเลือดปนมาปริมาตร 1 มล.ใส่ไว้ในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มล.เก็บในตู้เย็นที่ -20°ซ. เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

<u>การผลิต Monoclonal antibody</u> (De Boer and Wiecyzorek, 1984.; Morton *et al.,* 1966.; Kohler and Milstein, 1975)

เชื้อ R. solanacearum สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งถูกเตรียมเช่นเดียวกับที่ใช้ผลิต Pab ที่กล่าวแล้วข้างต้นแต่ฉีดเข้าสัตว์ทดลองซึ่งเป็นหนู (BALB/c mice) ด้วยปริมาตรของเชื้อแบคทีเรียที่ผสม Freund's incomplete adjuvant แล้ว 0.5 มล. โดยฉีดเข้าช่องท้องของหนู (intraperitoneal injection) 3 ครั้งแต่ละครั้งห่างกัน 14 วัน โดยฉีดครั้งที่ 2 และ 3 ไม่ต้องผสม Freund's incomplete adjuvant จากนั้นทุก 3 วัน หลังจากฉีดครั้งที่ 3 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหางของหนูปริมาตร 3-5 หยด เพื่อนำไปตรวจหาค่าไตเตอร์และความจำเพาะเจาะจงกับแอนติเจนที่ใช้ฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลองทำนองเดียวกับที่อธิบายแล้วในการผลิต Pab

เมื่อได้ช่วงค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม ทำการฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้าย 2-3 วัน ก่อนที่จะทำการรวมเซล (cell fusion) จากนั้นเตรียมเซลมายอีโลม่า (Myeloma cell) ก่อน โดยถ่ายเซลดังกล่าวออกจาก stock cell culture ที่เก็บไว้ภายใต้สภาพไนโตรเจนเหลว นำมาเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่ปลอดเชื้อ (sterile) และเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37° ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 90 % และบรรยากาศแก๊สคาร์บอนไดออกไซย์ 5 % เลี้ยงจนกระทั่งได้ความเข้มข้นของเซล 10^6 เซลต่อ มล.โดยการนับเซลจากสไล้ด์ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Haemocytometer) ตรวจนับเซลด้วยกล้องอินเวอส์เตด (Inverted microscope) เมื่อเลี้ยงจนได้ความเข้มข้นของเซลตามต้องการแล้วเก็บเกี่ยวเซลโดยการนำอาหารดังกล่าวไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ 400 g. นาน 5 นาที จากนั้นเทซุปเปอร์นาแต๊นทิ้งละลายตะกอนเซลด้วยอาหาร DMEM ที่ไม่ใส่ Fetal calf serum ใส่ในหลอดพลาสติกที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มล. แล้วปรับความเข้มข้นของเซลมายอีโลม่าให้ได้ $5x10^7$ เซลต่อมล. จากนั้นเอาเซลม้ามออกจากตัวหนู (ที่ผ่านการตรวจหาค่าไตเตอร์ที่สูงพอแล้ว) ด้วยวิธี Cervical dislocation ซึ่งเป็นการฆ่าหนูโดยการวางยาสลบไซยานายในภาชนะแก้วที่ปิดสนิท เมื่อหนูสลบสนิดแล้วนำหนูมาผ่าท้องแล้วใช้ปากคีบที่สะอาดคีบดึงเอาม้ามที่อยู่ในช่องท้องออกมาแล้วเฉือนเอาไขมันที่ติดมากับม้ามออกให้หมด นำ ม้ามมาบดผ่านตะแกรงบดเซลเพื่อให้เซลม้ามแยกจากกันเป็นเซลเดี่ยว จากนั้นย้ายเซลม้ามที่บดแล้วใส่ในอาหาร DMEM 5 มล.ขั้นตอนในการนำเซลม้ามมาเลี้ยงใน DMED นี้ต้องทำอย่างรวดเร็วเพื่อให้เซลม้ามมีสภาพที่แข็งแรงมากที่สุด โดยปล่อยให้เศษม้ามชิ้นใหญ่ตกตะกอนแล้วใช้หลอดฉีดยาพร้อมเข็มเบอร์ 18 ดูดเอาแต่อาหารใสที่อยู่ส่วนบนซึ่งจะมีเซลม้ามละลายปนอยู่ใส่ในหลอดพลาสติกที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มล. แล้วปรับความเข้มข้นของเซลม้ามให้ได้ $5x10^7$ เซลต่อมล. โดยการนับเซลเหมือนที่กล่าวข้างต้นจากนั้นเอาเซลม้ามและเซลมายอีโลม่าที่อยู่ในอาหาร DMEM ทั้งคู่มารวมกันในปริมาตรที่เท่ากันประมาณ 3-5 มล. ในหลอดพลาสติกที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มล. จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ 400 g. นาน 10 นาที และค่อย ๆ ดูดซุปเปอร์นาแต๊นทิ้งจากนั้นค่อย ๆ ละลายตะกอนเซลอย่างช้า ๆ ด้วย PEG 1 มล. โดยให้หลอดดังกล่าวหมุนอยู่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ. ให้ตะกอนเซลละลายหมดใน 2 นาที แล้วค่อย ๆ เติมอาหาร DMEM อย่างช้า ๆ ลงไปในหลอดจนครบ 50 มล.ภายในเวลา 5 นาที ปล่อยให้อยู่ในอ่างอีก 5 นาที่ จากนั้นนำหลอดข้างต้นไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ 400 g. นาน 10 นาที แล้วค่อย ๆ ดูดซุปเปอร์นาแต๊นทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลอย่างช้า ๆ ด้วย HAT media 48 มล. ที่ผสมด้วย BM condimate 2 มล. (1 % ของ BM condimate เป็นสารที่ช่วยบำรุงให้ Hybridoma cell ที่เกิดจากการรวมตัวของเซลมายอีโลม่าและเซลม้ามสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้สูง) จากนั้นค่อย ๆ ดูดอาหารที่มีเซลไฮบริดโดม่าถ่ายลงในจานเลี้ยงเซลชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 ul. ต่อหลุม จนหมดอาหาร ปิดฝาแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ. บรรยากาศ 5 % CO_2 และความชื้นสัมพัทธ์ 90 % ระหว่างที่เลี้ยงเซลไฮบริดโดม่าซึ่งจะเจริญเติบโตโดยการแบ่งเซลตามคุณสมบัติของเซลมายอีโลม่าซึ่งเป็นเซลมะเร็งที่สามารถแบ่งเซลด้วยตัวเองได้ในขณะที่เซลม้ามซึ่งสามารถสร้าง immunoglubolin ที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติบอดี้ที่จำเพาะกับเชื้อ R. solanacearum ได้ ดังนั้นเซลไฮบริดโดม่าจึงสามารถแบ่งเซลและสร้างแอนติบอดี้ได้พร้อมกันในเซลเดียว ทุก ๆ 2-3 วัน จะต้องเอาจานเลี้ยงเชื้อมาตรวจดูว่าเซลไฮบริดโดม่ามีการ

เจริญเติบโต ดีหรือไม่และต้องคอยเปลี่ยนอาหารโดยสังเกตจากสีของอาหารถ้าสีของอาหารซีดจางลงแสดงว่าเซลมีการเจริญและใช้อาหารไปทำให้อาหารสีจางลงซึ่งต้องเปลี่ยนอาหารโดยการดูดเอาอาหารเก่าออกแล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ใส่แทน อาหารเก่าที่ดูดออกให้นำมาทดสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับ homologous antigen ซึ่งเป็นแอนติเจนแบบเดี่ยวกับที่ฉีดเข้าสัตว์ทดลองเหมือนกับที่ทดสอบกับ Pab ถ้าหลุมไหนให้ปฏิกิริยาเป็นบวกให้ทำเครื่องหมายไวพร้อมกับบันทึกประวัติการเลี้ยงและผลการทดสอบที่แสดงว่ามีการสร้างแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเชื้อนี้ ส่วนหลุมที่มีปฏิกิริยาเป็นลบแสดงว่าไม่มีการสร้างแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อเชื้อหรือไม่มีเซลไฮบริดโดม่าที่มีชีวิต ซึ่งเป็นหลุมที่เราไม่ต้องการ ให้ปล่อยทิ้งไป ในกรณีของหลุมที่เป็นบวกให้เลี้ยงจนกระทั่งสามารถสังเกตเห็นเซลไฮบริดโดม่าเกาะเป็นกลุ่มอยู่ก้นหลุมและข้างหลุมหรือส่องดูด้วยกล้องอินเวอส์เตด เมื่อพบว่ามี เซลไฮบริดโดม่าปริมาณมากพอ ก็ย้ายเซลไฮบริดโดม่าพร้อมอาหารในหลุมนั้นโดยใช้ไปเปปที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดอาหารเข้าออก ๆ หลาย ๆ ครั้งเพื่อให้เซลหลุดจากการเกาะกันเองหรือเกาะยึดติดกับผนังหลุมแล้วย้ายมาไว้ในจานอาหารเลี้ยงเซลขนาด 36 หลุม และ 24 หลุม ตามลำดับเพื่อเลี้ยงเซลในทำนองเดี่ยวกับที่ได้อธิบายมาแล้วพร้อมจดบันทึกประวัติของเซลที่ผ่านมาในแต่ละหลุมที่มีปฏิกิริยาเป็นบวกเพื่อจะใช้เป็นชื่อเรียกของโคนเซลที่จะได้ต่อไป จากจานเลี้ยงเซลขนาด 24 หลุม เมื่อมีเซลขึ้นหนาแน่นพอก็ถ่ายเก็บไว้ในหลอดไมโครทิวบ์หลอดละ 1 มล. ผสมสารช่วยในการเก็บรักษาเซล Thymocyte-containing cloning media ปริมาตร 20 ul. ต่อหนึ่งหลอด เพื่อเก็บรักษาไว้ภายใต้ไนโตรเจนเหลวเพื่อใช้ทดลองต่อไป

จากนั้นนำเซลไฮบริดโดม่าที่เก็บรักษาไว้มาเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลเหมือนข้างต้นโดยตรวจนับจำนวนเซลด้วยเทคนิคเดียวกับที่กล่าวข้างต้นแล้วนำมาเจือจางจนมีความเข้มข้นของเซล 1 เซลต่อปริมาณอาหาร 100 ul. แล้วดูดอาหารใส่จานเลี้ยงเซล 100 ul. ต่อหนึ่งหลุม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อชนิด 96 หลุม แล้วเริ่มเลี้ยงเซลใหม่จากหลุมที่มีเซลไฮบริโดม่าเพียง 1 เซล ตามวิธีการแบบเดียวกับที่กล่าวข้างต้น เซลไฮบริ โดม่าที่สามารถเพิ่มปริมาณจากหนึ่งเซลและมีปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็นบวกก็จะเป็นไฮบริ โดม่า 1 โคน หรือโมโนโคลนอล 1 โคน ตั้งชื่อโคนตามประวัติของหลุมที่ผ่านการทดสอบ ที่ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกตามที่ได้บันทึกไว้ในการเปลี่ยนหลุมแต่ละครั้ง ซึ่งโมโนโคนที่ได้นี้สามารถเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลชนิดทีฟลาสขนาด 25 มล. หรือ 50 มล. หรือ 75 มล.หรือเครื่องเลี้ยงเซล mass media celline เพื่อให้ได้อาหารจำนวนมากเพื่อใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

<u>การเตรียมเชื้อ R.solanacearum เพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา</u>

ใช้เชื้อบริสุทธิ์ R.solanacearum ที่แยกได้จากพืช 18 ชนิดครอบคลุม 2 ชนิด race และ 3 ชนิด biovar (ตารางที่2) ที่เก็บรักษาเชื้อไว้ใน น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อในหลอดทดลองชนิดฝาเกลียวเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อในการทดลองโดยเขย่าหลอดดังกล่าวเพื่อให้เชื้อกระจายตัวแล้วใช้เข็มเขี่ยชนิด loop แตะน้ำเชื้อ 2 ลูปแล้วนำมาลากบนอาหาร TTC เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวโดยวิธีทางจุลชีววิทยาภายใต้ aseptic technique แล้วเก็บในตู้ 30° ซ. นาน 2-3 วัน เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะสีขาวคล้ายน้ำนมเป็น เมือกมันเยิ้มนูนเล็กน้อยและมีตะกอนสี

ชมพูสะสมอยู่ตรงกลางโคโลนี ย้ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวไปเลี้ยงในหลอดอาหารเอียง (kelman slant) เก็บในตู้ 30° ซ. นาน 2-3 วัน เชื้อจะขึ้นเต็มหลอด ย้ายเชื้อ 2 ลูปใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5 มล.เสร็จแล้วนำไปปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 cfu ต่อโคโลนี (obtical density = 0.05 ที่ความยาวคลื่น 600 nm.) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดสอบเปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของ Pab และ Mab โดยวิธี Indirect ELISA

ผสมสารละลายเชื้อ *R.solanacearum* ที่เตรียมไว้ตามคำอธิบายข้างต้นปริมาตร 4.5 มล. ด้วยสารละลาย coating buffer (carbonate buffer) ชนิด 10x ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีแล้วดูดใส่ในหลุมของจานอีไลซ่าชนิดโพลีซอร์ปขนาด 96 หลุม โดยใส่ตัวอย่างละ 2 หลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในตู้ 37° ซ นาน 4 ชม. หรือ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ 4° ซ จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T โดยใส่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อหลุม และล้างด้วยเครื่องล้าง Miniwashing Danatech Laboratory Inc, USA ทำ 3 ครั้งแต่ละครั้งใช้เวลา 30 วินาที แล้วคว่ำเคาะจานอีไลซ่าบนกระดาษสะอาดหลาย ๆ ครั้ง จากนั้นจะทำต่อหรือจะเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4° ซ ก็ได้ โดยนำมาทำกับชุดตรวจสอบแบบสำเร็จเรียกว่า ABC-kit เริ่มด้วยการบล็อกด้วย blocking buffer 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 60 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น จากนั้นใส่ primary antiserum (polyclonal antibody ที่ได้จากซีรัมของกระต่ายที่ถูกกระตุ้นจากเชื้อ *R. solanacearum* ที่เกิดโรคกับมันฝรั่ง) ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเดียวกับที่ได้จากการหาค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม โดยใส่ในปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 1-2 ชม. จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้น แล้วใส่ secondary antiserum ซึ่งเป็น IgG conjugate with biotin ที่อยู่ในชุดสำเร็จปริมาตร 1 หยดต่อ PBS 15 มล. แล้วดูดปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใส่ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 45 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร APH ที่อยู่ในชุดสำเร็จดังกล่าวปริมาตร 1 หยดต่อหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ นาน 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย PBS-T ตามกรรมวิธีที่กล่าวข้างต้นแล้วใส่ด้วยสาร ABTS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมแล้วบ่มที่ 37° ซ หรือเก็บที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งสารในหลุมที่เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10-30 นาที ซึ่งสังเกตได้จากสีของกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็นสีเขียวแกมน้ำเงินชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 % SDS (sodium dodecyl sulfate) จากนั้นนำมาอ่านด้วยเครื่องอ่านอีไลซ่าตั้งค่าความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยการทดลองนี้มีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดบวกเป็น homologous immunogen ซึ่งเป็นสารเริ่มต้นที่ใช้ฉีดเข้าสัตว์ทดลองในการผลิตแอนติซีรัมด้วยอัตราความเข้มข้นเดียวกับสารละลายเชื้อข้างต้น และมีกรรมวิธีเปรียบเทียบชนิดลบเป็น น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ , carbonate buffer, blocking buffer, PBS buffer, BSA และเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้แก่ *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens, และ Xanthomonas camprestis* pv.*incoanae*

โดยนำค่า OD ที่อ่านได้จากเครื่อง ELISA reader ในแต่ละหลุมที่มีเชื้อ *R. solanacearum* ที่แยกได้จากพืช 18 ชนิดครอบคลุม 2 ชนิด race และ 3 ชนิด biovar หาค่าเฉลี่ย OD ของแต่ละไอโซเลทจาก 2

หลุม เปรียบเทียบกันระหว่างค่าที่อ่านได้จาก Pab กับ Mab แต่ละโคนแล้วทำการคัดเลือก Mab เฉพาะโคนที่แสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่แตกต่างจาก Pab ในลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ชนิดพืชอาศัย , ชนิด race และหรือ ชนิด biovar จากนั้นนำ Mab โคนที่ให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่แตกต่างจาก Pab บันทึกคุณสมบัติที่แตกต่างดังกล่าวของแต่ละ Mab สำหรับนำไปปรับใช้ในชุดตรวจสอบ ELISA kit ต่อไป

<u>การนำ Mab มาปรับใช้แทน Pab ของชุดตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ในมันฝรั่ง</u>

โดยใช้อาหารที่เลี้ยงเซล Mab ที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *R. solanacearum* แตกต่างในระดับพืชอาศัย, race และหรือ biovar สูงกว่าและแตกต่างจาก Pab นำ Mab ดังกล่าวมาเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลชนิดทีฟลาสขนาด 25 มล. หรือ 50 มล. หรือ 75 มล.หรือนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นด้วยเครื่องเลี้ยงเซลปริมาณมาก (Mass media celline) โดยการถ่ายเซลไฮบริดโดม่าจาก stock culture cell และเลี้ยงด้วยอาหารชนิดและสภาพเดียวกับที่เลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณอาหารจำนวนมากพอซึ่งในอาหารนั้นจะมีแอนติบอดี้อยู่ด้วย แล้วนำอาหารที่ได้จากการเลี้ยงเซลใช้แทน Pab ที่ใช้ในชุดสำเร็จตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* (NCM ELISA test kit for Detection of *R. solanacearum*) โดยทำการทดสอบหาความเข้มข้นของ Mab ที่เหมาะสมว่าจะต้องใช้ที่ความเข้มข้นเท่าไหร่ถึงจะเหมาะสมและสามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่ชัดเจนเมื่อนำมาปรับใช้กับชุดตรวจสอบ

เวลาและสถานที่ ต.ค. 2542 ถึง ก.ย. 2546
กลุ่มงานบักเตรีวิทยา, กลุ่มวิจัยโรคพืช, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดสอบเปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา*ของ* Pab *และ* Mab *สามารถสรุปได้ดังนี้*

1. ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาของ Pab ที่ได้จากการทดลองนี้ไม่สามารถให้ความแตกต่างต่อเชื้อ R.solanacearum ที่พบใน กระเพรา , ยูคาลิปตัส และมะเขือเปราะ โดยแสดงปฏิกิริยาเป็น weak reaction ในขณะที่ Mab10 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับกระเพรา ส่วน Mab12 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับกระเพราและยูคาลิปตัส Mab18 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับมะเขือเปราะ

2. Mab1, 3, 5, 15, 19 และ 21 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับมันฝรั่งไบโอวา 2 กับ 4 แต่เป็น weak reaction กับ ไบโอวา 3 ขณะที่ Mab 9 และ 22 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับมันฝรั่ง biovar 3 แต่เป็น weak reaction กับ biovar 2 และ 4
3. Mab 2, 4, 6, 8, 13, 14, 16 และ 17 ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาไม่สามารถให้ความแตกต่างต่อเชื้อ *R.solanacearum* ทั้งต่อพืชอาศัยและชนิดของไบโอวา
4. Mab 7 และ 18 มีปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่ใกล้เคียงกับ Pab สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับพริก, มะเขือยาว, ถั่วลิสง, ดาวเรือง, มันฝรั่ง, งา, ยาสูบ, มะเขือเทศ, มะเขือเปราะ, ผักบุ้งและวัชพืช
5. Mab 11 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาป็น strong reaction กับเชื้อดังกล่าวที่แยกได้จากกระเพรา
6. Mab21 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับทานตะวันที่ปลูกทางภาคอีสาน, ขิงชนิดไบโอวา3, ดาวเรืองชนิดไบโอวา3, มันฝรั่งชนิดไบโอวา2และ4 และมะเขือเทศ แต่ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาจะเป็น weak reaction กับหน้าวัวที่ปลูกทางเหนือ, ขิงและดาวเรืองชนิดไบโอวา4, มันฝรั่งชนิดไบโอวา3 และมะเขือเปราะ
7. Mab7สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับปทุมมาชนิดไบโอวา3 แต่จะ*เป็น* weak reaction กับไบโอวา 4
8. Mab1, 3 และ 5 สามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับสามารถแสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาเป็น strong reaction กับหน้าวัวทางภาคอีสานแต่จะเป็น weak reaction กับทานตะวันที่ปลูกที่ภาคเหนือ

การนำ Mab มาปรับใช้แทน Pab ของชุดตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum*

1. ความเข้มข้นของ Mab 9 และ 22 ที่เหมาะสมและสามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* race 1 biovar 3 เมื่อใช้ในชุดตรวจสอบคือ 1:2 และ 1:5 เท่าตามลำดับ โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวทำละลาย
2. ความเข้มข้นของ Mab 21 ที่เหมาะสมและสามารถใช้ตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* race 3 biovar 2 และ race 1 biovar 4 เมื่อใช้ในชุดรวจสอบคือ 1:5 เท่าโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวทำละลาย

วิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันโรคเหี่ยวเป็นโรคที่สำคัญและระบาดไปทั่วโลกในขณะที่การควบคุมโรคนี้ด้วยสารเคมีก็ไม่ประสบผลสำเร็จและไม่แนะนำให้ใช้ กล ยุทธ์ที่ได้ผลในการป้องกันกำจัดโรคนี้ที่ใช้ในปัจจุบันได้แก่ การป้องกันโรค การลดการระบาดของโรค การหลีกเลี่ยงโรค โดยวิธีการที่ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพในทาง

ปฏิบัติคือการควบคุมไม่ให้มีการระบาดของโรคโดยติดไปกับผลิตทางการเกษตรซึ่งจะเป็นการหยุดการแพร่กระจายของโรคนี้ไว้ตั้งแต่ในระยะเริ่มต้นซึ่งเชื้อสาเหตุโรคนี้สามารถแผงติดไปในผลิตผลเกษตรโดยไม่สามารถตรวจพบอาการของโรคให้เห็น ขณะนี้วิธีการที่ใช้กันแพร่หลาย ได้ผลดีและเป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดได้แก่วิธีการตรวจหาโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยาซึ่งต้องการการสนับสนุนทางวิชาการเป็นอย่างมากในเรื่องของการผลิตแอนติซีรัมที่มีคุณภาพดีให้ผลการตรวจที่เที่ยงตรงซึ่งส่วนหนึ่งของคุณสมบัติดังกล่าวคือต้องการแอนติซีรัมที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อในระดับที่ทันกับการจำแนกเชื้อโรคนี้ ในการทดลองนี้ได้ผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี้ตามวิธีการของนักวิจัยที่มีความชำนาญและเชี่ยวชาญทางด้านนี้เป็นอย่างดีทั้งในประเทศและต่างประเทศทำให้ได้แอนติซีรัมที่แสดงให้เห็นคุณสมบัติที่มีความจำเพาะต่อเชื้อดังกล่าวลึกถึงในระดับของพืชอาศัยชนิดของ race และชนิดของ biovar แต่อย่างไรก็ดี ส่วนมากของโมโนโคลนอลแอนติบอดี้ที่ผลิตได้ก็ยังมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับโพลีโคลนอลซึ่งก็เป็นข้อดีในแง่ของการนำไปใช้ในงานที่ต้องการ*แสดงปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่เป็น broad spectrum ทำให้เราสามารถมีชุดสำเร็จที่สามารถนำไปตรวจหาเชื้อ R. solanacearum* ทั้งชนิดที่เป็น broad spectrum และชนิดที่มีความจำเพาะต่อระดับ race และ biovar อนึ่งสิ่งที่คิดว่าสำคัญที่ทำให้งานทดลองนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะการใช้สาร BM condimate ที่ช่วยให้เปอร์เซนต์การอยู่รอดของเซลไฮบริโดมาสูงซึ่งปกติเซลนี้จะตายไปในระหว่างการเลี้ยงเซลสูงมากและยังมีโมโนโคลจากเซลดังกล่าวอีกมากที่ยังเก็บไว้ในสต๊อกที่ยังไม่ได้นำมาศึกษาจึงเชื่อว่าน่าจะมี single epitope ที่อยู่ในเซลไฮบริโดมาที่ยังไม่ได้นำมาศึกษาอีกเป็นจำนวนมากที่มีความจำเพาะต่อเชื้อนี้ในคุณลักษณะอื่น ๆ อีกซึ่งจะได้นำมาทดลองในโอกาสต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

monoclonal antibody (Mab) 22 โคน จากเชื้อ *R. solanacearum* ของมันฝรั่ง นำมาทดสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี Indirect ELISA กับเชื้อนี้ในพืชอาศัยอื่นๆ 18 ชนิดครอบคลุม 3 ชนิด biovar ผลการทดสอบพบว่า Mab ที่ผลิตได้ 3 โคน สามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา (strong reaction) สูงกว่า Pab เมื่อทดสอบกับเชื้อนี้ของ กระเพรา ยูคาลิปตัส และ มะเขือเปราะ Mab 7 โคน สามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่มีความจำเพาะต่อ biovar 2 และ 4 สูงกว่า biovar 3 ของมันฝรั่ง ในขณะที่ Pab ไม่สามารถให้ปฏิกิริยาที่แตกต่างได้ ในขณะที่ Mab 2 โคน สามารถให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาที่มีความจำเพาะต่อ biovar 3 สูงกว่า biovar 2 และ 4 ของมันฝรั่ง เมื่อเปรียบเทียบกับ Pab ซึ่งไม่สามารถให้ความแตกต่างได้ Mab 3 โคน ให้ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา (strong reaction) biovar 3 สูงกว่า biovar 4 กับเชื้อนี้ของ ขิง ปทุมมา และ ดาวเรือง ในขณะที่ Pab ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ อย่างไรก็ดีในการศึกษานี้พบว่า Mab ส่วนใหญ่ที่ได้มีคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาที่ไม่แตกต่างจาก Pab จากนั้นได้นำเอา Mab ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอาศัยและ biovar ของเชื้อนี้มาปรับใช้กับชุดตรวจสอบสำเร็จ (NCM ELISA test kit) ที่ใช้เพื่อการตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ในมันฝรั่งโดยใช้แทน Pab ในชุดตรวจสอบดังกล่าว พบว่า Mab สามารถ

ตรวจหาเชื้อ *R. solanacearum* ถึงระดับ biovar และชนิดพืชอาศัยได้ จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของ Mab ที่นำมาปรับใช้ในชุดตรวจสอบจะมีความเข้มข้น 1:5 ถึง 1: 25 ซึ่งขึ้นอยู่กับแต่ละโคนของ Mab ที่จะนำมาใช้

คำขอบคุณ

การทดลองนี้ไม่อาจสำเร็จลงได้ถ้าไม่รับความช่วยเหลือจากหน่วยงานและบุคคลดังต่อนี้ Dr. Sylvie Priou และ Dr. Upali Jayasinghe แห่งศูนย์วิจัยมันฝรั่งนานาชาติ ที่ฝึกสอนและให้การสนับสนุนในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี้ สถาบันวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพและอนุรักษ์พันธุกรรมพืช ที่ให้ความช่วยเหลืองบประมาณหลักของการทดลองนี้ คุณนัตฎินา เนตรสุวรรณ์ แห่งศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ฝึกสอนเทคนิคการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี้และใช้ห้องปฏิบัติการในการเลี้ยงเซลและการฟิวส์เซล, Dr. Kennichi Tsuchiya แห่ง National Institute Agro-Environmental Science ที่ฝึกสอนวิธีการและให้ใช้ห้องปฏิบัติการและสารเคมีในการคัดเลือกโคนและทดสอบ*ปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา*โมโนโคลนอลแอนติบอดี้ JIRCAS และ JSPS ที่สนับสนุนทุนในการเดินทางไปทำวิจัย ณ . ประเทศญี่ปุ่น Prof. Dr. Nobuaki Matsuyama และ Prof. Dr. Kasuo Suyama แห่งมหาวิทยาลัย Tokyo University of Agriculture และ รศ. ดร. นิพนธ์ ทวีชัย ที่สนับสนุนให้ได้รับทุนจาก JSPS ซึ่งข้าพเจ้า นายวงศ์ บุญสืบสกุลขอกราบขอบพระคุณผู้มีพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

Buddenhagen, I.; L. Sequeira; and A. Kelman. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 52; 726.

Buddenhagen, I. 1985. Bacterial wilt revisited. Pages 126-143 *In*: Bacterial Wilt disease in Asia and the South Pacific, G. J. Presley G.J.(eds.). ACIAR, no 13. Canberra, Australia.

De Boer, S. H., and A. Wiecyzorek. 1984. Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum. Phytopathology* 74: 1431-1434.

Harris, D. 1972. Intra-specific variation in *Pseudomonas solanacearum*. Pages 289-292 *In*: Proc. 2nd. Int. Conf. Plant Path. Bact., Wageningen, The Netherlands.

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum. J. App. Bacteriol.*27:265–277.

Hayward, A.C. 1991. Biological and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum. Annu. Rev. Phytopathology* 26:65-87.

Hayward, A.C. 1994. Symtematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pages 123-135 *In*: Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum.* A.C. Hayward and G.L. Hartman (eds.). CABI, Wallingford.

He, L.; L. Sequera and A. Kelman. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum.* From China. *Plant dis.* 67:1357-1361.

Kohler, A. and C. Mitstein. 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.

Macario, A. J. L. and E.C. de Macario. 1985. Monoclonal antibodies against bacteria. Vol.1. Academic press, London, 320 pp.

Morton, D.; P. Dukes and S. Jenkens. 1966. Serological relationships of races 1, 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum. Plant Dis. Rep.* 50:275-277.

Oi, V. T. and L.A. Herzenberg. 1980. Immunoglobulin production hybrid cell lines. Pages 351-372 *In*: *Selected Methods in Cellular Immunology.* B.B. Mischell. and S.M. Shiigi. (eds.), W. H. Freeman Co., San Francisco.

Palleroni, N. J. and M. Doudoroff. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum. J. Bacteriology* 107:690-696.

Pegg, K. and M. Moffet. 1971. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearu.*in Queensland. *Aust. J.Exp. Agric. Anim. Husb.* 11:696-698.

Seal, S.E., and J.G. Elphinstone. 1994. Advance in Identification and Detection of *Pseudomonas solanacearum.* Pages 123-125 *In*: Bacterial Wilt: The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum.* A.C. Hayward. and G.L. Hartman (eds.) CABI, Wallingford.

Yabuuchi, E.; Y. Kosako; I. Yano; H. Hotta and Y. Nishiuchi. 1995.Transfer of 2 *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov., Proposal of *Ralstonia picketti* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) comb. Nov., *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. Nov. *Microbiol. Immunol*. 39:897-904.

ารางที่1. ความเข้มข้นของโพลีโคลนอลและแต่ละโมโนโคลนอลลอแนติบอดี้ที่มีต่อ homologous immunogen ที่สามารถอ่านค่าปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาได้ชัดเจน (OD > 1.5)

หมายเลข โมโนโคลนอลแอนติบอดี้	ประวัติการคัดเลือก โมโนโคลนอลแอนติบอดี้	ความเข้มข้นของแอนติบอดี้ Homologous Immunogen
1	2H11B5E2 (Mab1)	1: 400
2	2C9A6B11 (Mab2)	1: 200
3	2F7D3H2 (Mab3)	1: 400
4	2E11A8C1 (Mab4)	1: 400
5	2H10A6F2 (Mab5)	1: 200
6	2E9A8D6 (Mab6)	1 : 25
7	2E8H1D1 (Mab7)	1: 200
8	2B8F1E5 (Mab8)	1: 200
9	3C10C4H6 (Mab9)	1: 200
10	3H11F5D2 (Mab10)	1: 50
11	3C11A7D9 (Mab11)	1: 200
12	3C8H2B6 (Mab12)	1: 200
13	3F11B10C12 (Mab13)	1: 100
14	3H11F4C1 (Mab14)	1: 200
15	3B11H8C9 (Mab15)	1: 100
16	4C12D1F4 (Mab16)	1: 50
17	4C11F6D12 (Mab17)	1: 200
18	1F11D1C10 (Mab18)	1: 200
19	1A11B9B3 (Mab19)	1: 400
20	1G11F1B3 (Mab20)	1 : 25
21	1F4G4G12 (Mab21)	1: 200
22	1B11A8B9 (Mab22)	1: 200
โพลีโคลนอล	PAb	1: 15,000

Scanned by CamScanner

ตาราง 2. เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดี้กับโพลี่โคลนอลแอนติบอดี้ต่อเชื้อ Ralstonia solanacearum ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่าง ๆ

ชนิดพืชอาศัยของ *R. solanacearum*	แหล่งที่พบเชื้อ	ชนิด Biovar	Monoclonal Antibody no.																					Polyclonal antibody
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
หน้าวัว	N	3	3	5	1	3	1	5	5	3	4	4	3	3	6	6	3	6	3	5	4	4	2	5	6
หน้าวัว	N	3	2	6	1	4	1	7	7	4	4	5	3	3	7	5	4	7	2	6	4	7	2	5	8
หน้าวัว	N	3	1	5	1	3	1	6	7	6	6	6	4	4	7	5	3	7	2	6	4	7	2	6	8
หน้าวัว	NE	3	7	7	5	6	6	7	8	7	3	8	7	5	7	7	7	8	8	6	7	8	7	8	8
กระเพรา	W	3	1	5	2	2	1	2	6	6	7	10	8	10	7	4	3	7	2	5	3	3	2	8	4
พริกขี้หนู	N	3	7	8	6	5	6	7	8	6	6	7	6	7	7	6	7	8	7	10	6	8	6	7	10
พริกขี้หนู	N	2	7	8	7	5	7	7	8	6	6	5	7	7	7	6	7	7	7	10	7	8	7	6	10
ปทุมมา	N	4	2	4	1	1	1	3	3	4	3	4	6	8	5	3	2	5	2	4	3	2	1	6	10
ปทุมมา	NE	4	2	5	1	3	2	4	3	4	5	5	7	6	6	5	3	6	2	6	4	7	2	7	8
ปทุมมา	W	4	2	7	2	4	1	3	4	7	5	8	9	10	7	6	5	7	5	10	5	6	2	8	9
ปทุมมา	N	4	3	7	3	5	2	4	4	2	3	2	3	2	8	6	6	7	5	10	6	8	3	4	10
ปทุมมา	N	3	1	5	1	2	1	3	7	6	6	9	8	10	7	5	4	7	2	8	4	7	1	8	8
ปทุมมา	N	3	2	6	1	3	1	3	8	4	7	5	6	6	8	5	4	8	2	9	4	7	2	7	10
มะเขือยาว	NE	4	7	6	7	5	6	7	7	7	7	6	7	9	7	6	6	8	7	10	7	8	6	7	10
มะเขือยาว	N	3	7	8	8	6	7	7	7	8	5	7	5	7	7	8	6	7	8	7	10	8	8	7	7	10
ยูคาลิปตัส	W	3	1	2	1	1	1	2	2	4	4	4	5	9	6	3	2	5	2	2	2	2	2	3	4
ขิง	W	4	6	7	5	6	6	7	9	6	5	6	7	5	7	7	6	7	7	10	7	8	4	7	10
ขิง	N	4	3	7	3	5	3	7	8	4	4	6	7	6	7	7	6	7	6	10	6	9	2	7	10
ขิง	W	4	1	7	3	1	1	7	7	5	7	5	7	8	7	4	2	7	3	8	5	8	1	6	7
ขิง	N	4	1	4	1	1	1	4	4	4	6	5	7	8	3	1	2	6	2	3	1	2	1	5	10
ขิง	N	4	1	6	1	3	1	5	5	8	7	10	10	10	6	6	3	6	2	6	4	7	1	8	7
ขิง	N	4	2	6	1	4	2	8	8	6	6	7	8	7	7	6	5	7	1	7	4	7	2	8	8
ขิง	N	3	6	6	6	5	6	6	6	4	5	6	7	6	6	6	7	6	6	10	6	8	7	7	10
ขิง	N	3	8	8	8	6	8	9	9	7	8	8	8	8	8	7	8	7	8	10	8	8	8	6	10
ขิง	N	3	5	5	6	4	5	8	8	5	8	6	8	8	7	6	6	7	7	10	6	8	7	8	10
ขิง	N	3	7	7	7	3	6	8	8	4	8	5	6	7	8	6	7	8	7	10	7	8	7	7	10

Scanned by CamScanner

50

ใ2. เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระหว่างไมโครคนอนเบอดีกับโพลีโครคนอนเบอดีต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่าง ๆ (ต่อ)

พืชพืชอาศัยของ	แหล่ง	ชนิด	Monoclonal Antibody no.																					Polyclonal
R. solanacearum ที่ทดสอบ		Biovar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	antibody
ถั่วลิสง	N	4	4	5	4	3	4	7	7	6	7	7	7	10	7	5	4	6	6	6	10	4	7	5	8	8
ถั่วลิสง	W	4	7	8	7	7	10	9	9	1	2	1	4	2	7	7	8	8	7	10	8	8	8	7	3	7
ถั่วลิสง	E	4	6	8	8	5	6	8	8	1	3	2	2	2	7	7	7	7	7	10	3	4	3	6	6	10
ถั่วลิสง	N	4	3	4	4	1	4	6	6	6	6	6	7	7	5	3	3	5	6	10	5	7	3	4	8	8
ถั่วลิสง	N	4	5	7	6	2	4	7	7	10	6	10	9	10	7	5	6	7	8	10	5	7	7	8	8	8
ถั่วลิสง	N	4	7	8	5	6	7	7	7	8	7	10	8	7	7	6	5	7	5	10	5	7	6	8	8	7
ถั่วลิสง	M	3	5	6	5	3	4	8	8	8	8	10	10	8	7	6	5	7	8	10	6	7	12	8	8	6
ถั่วลิสง	N	4	2	7	2	4	5	2	8	6	9	8	10	8	7	6	4	8	7	10	10	8	8	8	8	7
ถั่วเขียว	N	3	10	10	10	9	10	9	9	6	8	8	10	7	8	7	8	8	7	10	10	8	8	8	8	6
ถั่วเขียว	N	3	10	10	9	9	9	6	8	8	8	10	10	10	8	7	9	7	7	10	10	8	8	8	7	5
ถั่วเขียว	M	3	8	9	10	7	10	8	8	8	8	10	10	10	8	7	5	3	7	8	8	4	4	4	8	8
ถั่วเขียว	N	3	1	6	1	3	8	2	7	5	9	5	8	7	7	4	4	8	2	7	5	4	1	4	8	10
พริกหยิ่น	M	4	1	7	1	3	1	2	8	2	8	2	4	3	7	4	4	8	7	10	7	8	5	6	10	10
พริกหยิ่น	N	3	7	9	8	4	6	7	8	7	9	8	9	9	7	6	7	8	7	10	8	8	7	7	10	10
พริกหยิ่น	N	4	7	7	7	5	5	6	6	4	4	5	6	5	6	6	6	6	6	10	8	8	7	6	3	10
พริกขี้หนู	N	4	6	4	4	2	3	7	7	3	3	2	4	3	6	4	4	6	6	6	5	9	7	6	3	10
พริกขี้หนู	N	4	6	4	4	2	3	7	7	3	3	2	4	3	6	4	4	6	6	6	5	9	7	6	3	10
พริกขี้หนู	N	3	4	7	6	2	2	6	7	5	8	5	6	6	6	5	6	7	5	7	3	7	2	3	10	10
พริกขี้หนู	N	3	4	7	6	2	2	6	7	5	8	5	6	6	6	5	6	7	5	7	3	7	2	3	10	10
พริกขี้หนู	N	3	4	7	6	2	2	6	7	5	8	5	6	6	6	5	6	7	5	7	3	7	2	3	10	10
พริกขี้หนู	M	2	10	9	8	7	8	7	9	7	7	7	10	7	7	7	8	7	8	7	10	10	9	8	8	10
พริกขี้หนู	N	4	10	10	10	8	8	7	9	4	2	2	5	5	7	7	8	7	8	7	10	9	9	8	8	10
มันแกว	N	4	9	8	8	4	9	7	9	8	2	8	9	9	8	7	8	7	8	7	10	8	9	8	8	10
มันแกว	N	4	9	8	8	5	6	7	8	10	3	10	10	10	7	6	7	7	7	7	10	8	8	6	6	10
มันแกว	N	4	8	8	8	5	6	7	8	10	3	10	10	10	7	6	7	7	6	7	10	7	8	6	6	10
มันแกว	N	4	8	10	8	5	7	6	7	7	3	8	7	10	7	6	7	7	6	7	10	9	8	7	6	10
มันแกว	NE	4	9	9	10	8	10	7	7	4	3	7	6	5	7	7	7	7	6	7	10	7	8	6	6	10
มันแกว	N	4	7	7	6	6	7	7	8	4	4	4	1	2	7	6	8	7	7	7	10	7	8	6	6	10
มันแกว	NE	4	8	8	7	7	8	8	9	3	3	4	5	5	7	7	8	8	8	8	10	8	8	8	5	10
มันแกว	N	4	8	8	7	7	8	8	8	5	3	2	3	3	7	5	7	8	8	7	10	6	8	5	8	10
มันแกว	N	3	2	6	6	3	7	5	8	10	8	8	7	7	7	4	7	7	3	10	8	8	8	8	8	10

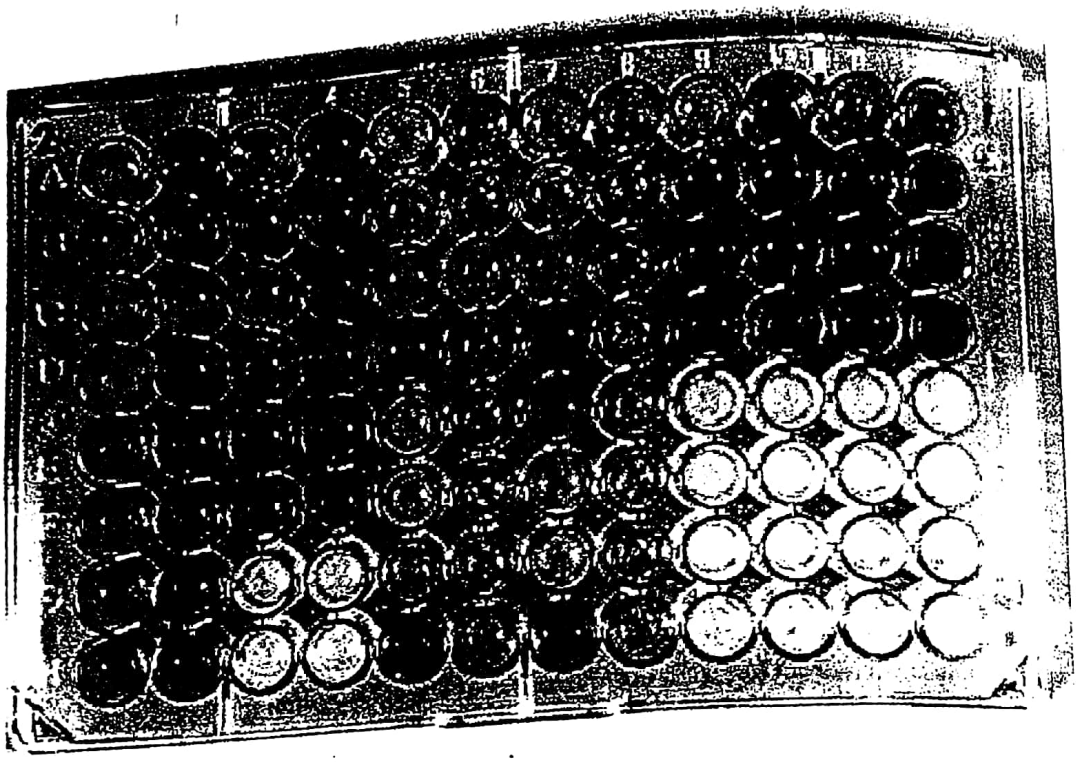
Scanned by CamScanner

2. เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระหว่างโมโนโคลนอลแอนติบอดีกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Ralstonia solanacearum ที่แยกได้จากพืชต่างๆ (ต่อ)

พันธุ์พืชอาศัยของ	แหล่ง	ชนิด	Monoclonal Antibody no.																					Polyclonal
R. solanacearu ที่ทนเชื้อ		Biovar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	antibody
มันฝรั่ง	N	3	1	6	1	3	1	4	8	7	8	7	8	8	7	5	3	7	3	8	2	8	7	8	9
มันฝรั่ง	NE	3	3	8	1	7	1	8	8	7	8	10	10	10	7	6	8	7	7	10	8	8	7	2	10
มันฝรั่ง	N	2	10	7	7	6	7	8	9	1	3	2	4	3	7	7	8	7	7	10	7	8	7	5	10
มันฝรั่ง	N	2	7	8	7	5	6	7	9	6	3	4	4	4	7	6	7	8	7	10	8	8	7	2	10
มันฝรั่ง	N	2	10	9	10	6	8	7	7	2	3	2	2	2	7	6	8	7	6	10	7	9	7	2	10
มันฝรั่ง	N	2	6	7	7	4	7	7	6	1	2	3	1	7	7	6	7	7	7	10	7	9	7	3	10
มันฝรั่ง	N	2	7	8	7	6	7	7	8	3	2	6	3	7	7	6	7	7	7	10	7	8	7	1	10
มันฝรั่ง	N	2	6	7	6	5	6	7	9	5	3	6	6	6	6	7	8	7	7	10	8	9	7	1	10
มันฝรั่ง	N	2	8	7	7	7	7	7	9	4	6	6	6	7	7	4	6	7	7	10	6	8	4	3	7
มันฝรั่ง	E	2	5	6	5	3	4	7	8	3	7	3	6	5	7	4	6	7	7	10	6	7	3	3	8
ขา	M	2	6	7	5	4	2	7	8	5	7	6	5	7	8	7	5	6	6	9	7	7	4	2	8
ยาสูบ	N	3	6	6	5	4	4	6	9	5	6	5	6	7	7	5	6	6	6	9	6	7	6	2	6
ยาสูบ	N	3	5	6	6	4	6	7	8	1	1	1	2	1	7	6	6	7	7	10	7	8	7	8	8
ยาสูบ	N	3	7	7	7	6	7	7	8	6	7	7	8	6	7	7	7	7	7	10	7	8	7	8	10
มะเขือเทศ	N	4	6	7	7	5	7	7	8	7	8	6	9	7	7	7	7	7	7	10	7	8	7	3	10
มะเขือเทศ	N	3	5	6	6	4	5	7	8	1	5	1	3	2	7	6	6	7	7	10	8	8	7	1	10
มะเขือเทศ	W	3	7	8	7	5	7	7	9	2	4	2	3	3	7	6	8	8	7	10	8	8	7	2	10
มะเขือเปราะ	W	4	8	10	8	6	6	8	8	3	4	2	4	5	7	6	8	7	7	10	10	10	8	4	10
มะเขือเปราะ	W	3	2	4	1	2	1	3	7	4	6	5	5	5	4	3	4	6	4	9	3	7	5	1	10
ผักบุ้ง	N	3	5	6	6	4	4	7	7	2	2	2	2	3	7	6	6	6	6	10	6	7	6	2	10
ผักบุ้ง	M	3	7	7	7	5	8	7	7	1	1	1	3	1	6	6	5	6	6	10	7	9	7	8	10
หญ้ายาง	M	3	7	7	7	6	5	7	9	6	8	6	8	6	7	6	6	7	7	10	7	8	6	7	10
หญ้ายาง	N	3	6	9	6	7	5	8	9	6	8	6	7	6	8	7	6	8	7	10	7	8	6	7	10
กรรมวิธีเปรียบเทียบลบ (สารเคมี)			1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
กรรมวิธีเปรียบเทียบลบ (เชื้อต่อ ๆ)			0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

การเปรียบเทียบค่า OD กับปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา คือ <0.2=0, 0.2-0.3=1, 0.3-0.4=2, 0.4-0.5=3, 0.5-0.6=4, 0.6-0.8=5, 0.8-1.0=6, 1.0-1.5=7, 1.5-1.8=8, 108-2.0=9 และ >2.0=

Scanned by CamScanner

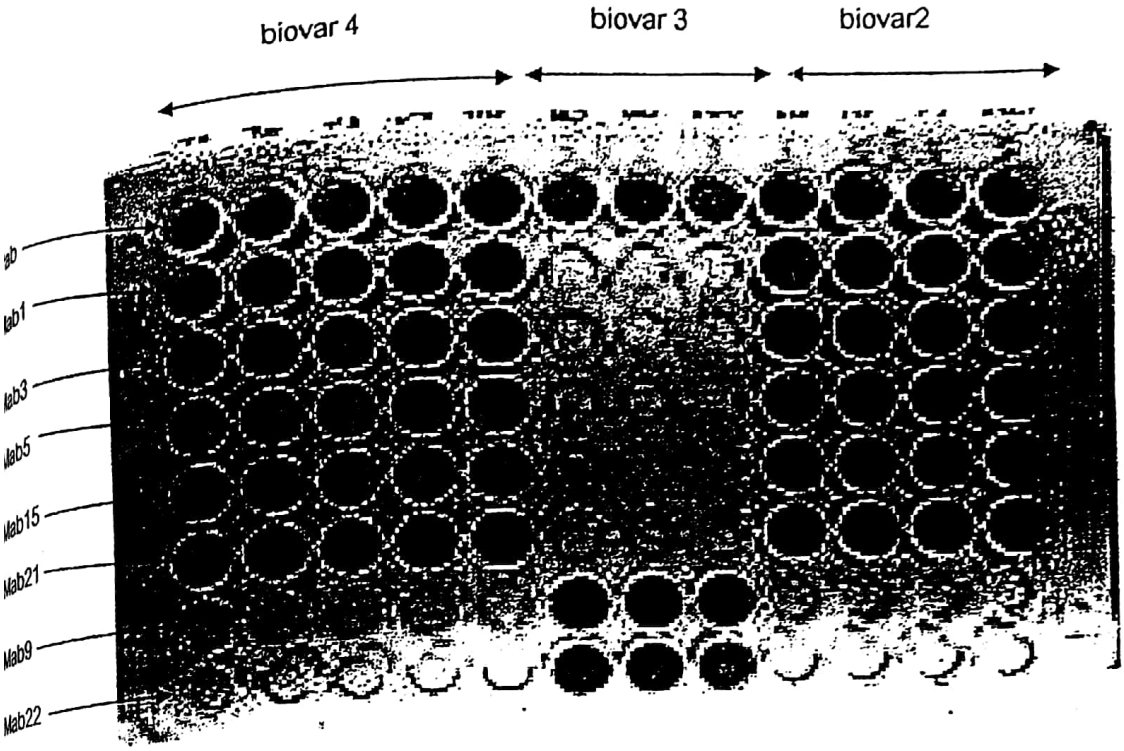


ภาพที่1 เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระหว่าง Pab กับ Mab ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกได้จากพืชอาศัยต่าง ๆ

แอนติเจน		แอนติบอดี้
Lane 1 และ 2 (A-D)	ขิง biovar 4	Lane 1 (A-H) Mab 21
Lane 1 และ 2 (E-H)	ขิง biovar 3	Lane 2 (A-H) Pab
Lane 3 และ 4 (A-D)	ปทุมมา biovar 4	Lane 3 (A-G) Mab 7
Lane 3 และ 4 (E,F)	ปทุมมา biovar 3	Lane 4 (A-G) Pab
Lane 3 และ 4 (G)	ไม่มีแอนติเจน	Lane 5 (A-D) Mab 1
Lane 3 และ 4 (H)	ไม่มีแอนติบอดี้	Lane 5 (E-H) Mab 3
Lane 5-8 (A-C , E-G)	หน้าวัวภาคเหนือ	Lane 6 (A-H) Pab
Lane 5-8 (D และ H)	หน้าวัวภาคอีสาน	Lane 7 (A-D) Mab 5
Lane 9-12 (A)	ดาวเรือง biovar 4	Lane 7 (E-H) Mab 21
Lane 9-12 (B-D)	ดาวเรือง biovar 3	Lane 8 (A-H) Pab
Lane 9-12 (E)	ไม่มี 2^{nd} antibody	Lane 9 (A-E, G, H) Mab17
Lane 9-12 (F)	ไม่มี ABPH	Lane 10 (A-E, G, H) Pab

Scanned by CamScanner

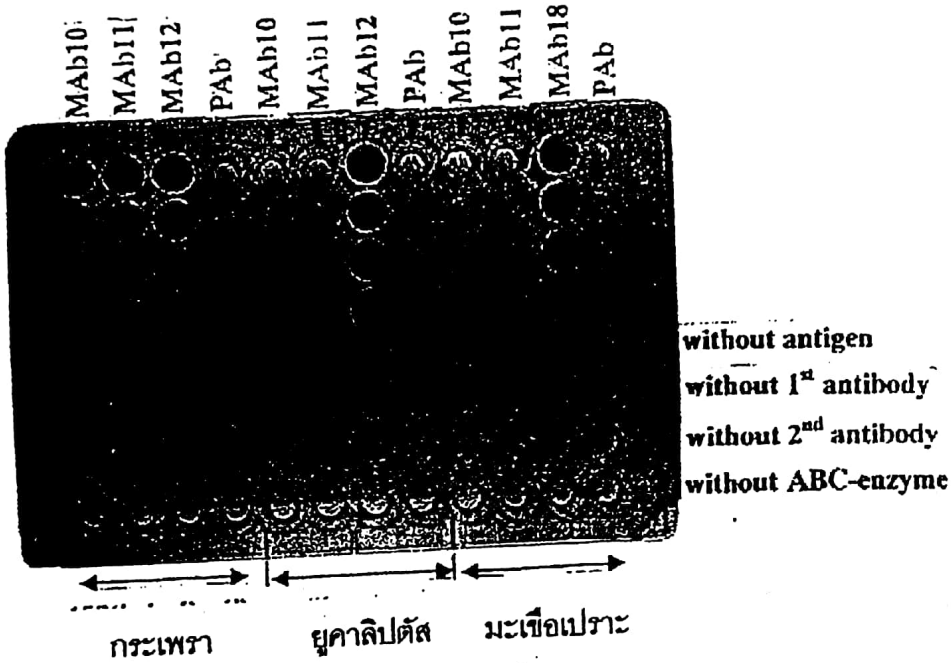
เชื้อ *Ralstonia solanacearum* แยกจากมันฝรั่ง 3 biovar



ภาพที่2 เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระหว่าง Pab กับ Mab ต่าง ๆ ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกได้จากมันฝรั่ง biovar ต่าง ๆ

แอนติเจน		แอนติบอดี้
Lane 1-5 (A-H)	มันฝรั่ง biovar 4	Lane A (1-12) Pab
Lane 6-8 (A-H)	มันฝรั่ง biovar 3	Lane B (1-12) Mab 1
Lane 9-12 (A-H)	มันฝรั่ง biovar 2	Lane C (1-12) Mab 3
		Lane D (1-12) Mab 5
		Lane E (1-12) Mab 15
		Lane F (1-12) Mab 21
		Lane G (1-12) Mab 9
		Lane H (1-12) Mab 22

Scanned by CamScanner



ภาพที่3 เปรียบเทียบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาระหว่าง Pab กับ Mab ต่าง ๆ ต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ที่แยกได้จากกระเพรา, ยูคาลิปตัสและมะเขือเปราะ

แอนติเจน		แอนติบอดี้
Lane 1-4 (A-H)	Rs.กระเพรา	Lane 1 (A-H) Mab 10
Lane 5-8 (A-H)	Rs.ยูคาลิปตัส	Lane 2 (A-H) Mab 11
Lane 9-12 (A-H)	Rs.มะเขือเปราะ	Lane 3 (A-H) Mab 12
		Lane 4 (A-H) Pab
		Lane 5 (A-H) Mab 10
		Lane 6 (A-H) Mab 11
		Lane 7 (A-H) Mab 12
		Lane 8 (A-H) Pab
		Lane 9 (A-H) Mab 10
		Lane 10 (A-H) Mab 10
		Lane 11 (A-H) Mab 18
		Lane 12 (A-H) Pab

Scanned by CamScanner

ประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ในการกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุด

The Effectiveness of Modified Vapor Heat Treatment Against Oriental Fruit Fly (Diptera : Tephritidae) in Mangosteen

อุดร อุณหวุฒิ **สลักจิต พานคำ**

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

ได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ในการกำจัดแมลงวันทอง oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) ในผลมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 ได้ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างไข่อายุ 24 ชั่วโมงและหนอนวัยที่ 1 เพื่อยืนยันไข่เป็นระยะการเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด โดยอบมังคุดกำจัดไข่และหนอนวัยที่ 1 ที่อุณหภูมิภายในสุดผลคงอยู่ที่ 45 °ซ. นาน 1:05, 1:10 และ 1:15 ชั่วโมง ผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าไข่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด ในการทดลองที่ 2 ได้ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดไข่ของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิผล 45 °ซ. นาน 1:25, 1:30 และ 1:35 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิผล 45 °ซ. นาน 1:30 ชั่วโมง สามารถกำจัดไข่ให้ตายทั้งหมด จากผลการทดลองนี้ ได้เสนอให้มีการประเมินประสิทธิภาพกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิผล 45 °ซ. นาน 1:35 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชสำหรับกำจัดไข่และหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันทองในผลมังคุดก่อนส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศญี่ปุ่น

ABSTRACT

Modified vapor heat treatment (MVHT) was tested for its effectiveness to destroy the oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.). In the 1st experiment, the tolerance of eggs and 1st instar larvae to MVHT were investigated to reconfirm that egg

is the most tolerant developmental stage of OFF in mangosteen. Fruits infested with 24-hours-old eggs and first instar larvae were subjected to MVHT at fruit center temperature of 45 ^{o} C for 1:15, 1:20 and 1:25 h. The results could be reconfirmed that egg is the most tolerant developmental stage. In 2nd experiment, MVHT at fruit center temperature of 45 ^{o} C for 1:25, 1:30 and 1:35 h. was tested for its effectiveness to eliminate eggs infesting in mangosteen. None of eggs treated survived after subjecting to MVHT of fruit center temperature 45 ^{o} C for 1:30 h. Based on results of this experiment, we proposed a minimum of 1:35 h at fruit center temperature of 45 ^{o} C to be evaluated further as a potential post-harvest quarantine treatment to disinfest mangosteen of eggs and all larval instars of the OFF prior to export to Japan.

คำนำ

การส่งมังคุด (*Garcinia mangostana* Linn.) ไปประเทศที่เข้มงวดด้านกักกันพืช ได้แก่ ญี่ปุ่น เกาหลี ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และสหรัฐอเมริกา จำเป็นต้องผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ก่อนส่งออก ได้มีการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (modified vapor heat treatment, MVHT) เพื่อใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) สำหรับกำจัดแมลงวันทอง oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera : Tephritidae) ในผลมังคุด ผลการศึกษาพบว่า ระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันทองที่พบทำลายอยู่ภายในผลมังคุด ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง มีความทนทานต่อความร้อนมากที่สุด (อุดร และคณะ , 2544 ก) การศึกษาวิจัยในรายละเอียดต่อมาพบว่า อัตราการตายของไข่จะสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อนในช่วงแรกของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (อุดร และคณะ, 2544 ข) โดยอัตราการตายของไข่จะลดต่ำลงเมื่อระดับความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงดังกล่าวลดต่ำลง ขณะที่ระยะเวลาซึ่งแตกต่างกันในการ อบมังคุดให้อุณหภูมิผลเพิ่มถึงระดับกำหนด กลับไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตายของไข่อย่างเด่นชัด (อุดร และ คณะ , 2544 ค) นอกจากนี้ การอบมังคุดกำจัดแมลงวันทองด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ขนาดผลของมังคุดเป็นปัจจัยที่ไม่มีผลกระทบต่ออัตราการตายของไข่เช่นเดียวกัน (อุดร และ คณะ, 2544 ง)

จากผลการศึกษาเบื้องต้นกำจัดไข่แมลงวันทองในผลมังคุดที่ผ่านมา ปรากฏว่า เมื่อมังคุดผ่านกรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิภายในสุดผลตรงบริเวณกึ่งกลางผลคงอยู่ที่ระดับ 45 ^{o} ซ. เป็นระยะเวลานานไม่น้อยกว่า 1:10 ชั่วโมง แมลงวันทองระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง ในผลมังคุดจะตายทั้งหมด (Table 1) โดยในการศึกษาเบื้องต้นกำจัดแมลงแต่ละอุณหภูมิที่กำหนด จะทดลองกำจัดไข่เป็นจำนวนน้อยประมาณ 700-1,000 ฟองเท่านั้น เนื่องจากวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์เป็น

วิธีการที่มีแนวโน้มจะสามารถกำจัดแมลงวันทองได้อย่างมีประสิทธิภาพได้มาตรฐานของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ดังนั้น จึงควรที่จะมีการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการนี้กับแมลงเป็นจำนวนมาก รายงานผลการวิจัยต่อไปนี้มีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ คือ (1). เพื่อยืนยันผลการศึกษาว่าไข่อายุ 24 ชั่วโมง ในผลมังคุดทนทานต่อความร้อนวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มากที่สุด (2). เพื่อกำหนดกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ที่มีประสิทธิภาพกำจัดไข่จำนวนไม่น้อยกว่า 3,000 ฟอง ในผลมังคุดให้ตายทั้งหมด

อุปกรณ์และวิธีการ

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model : EHK-1000B, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง มังคุดทดลองมีความสุกที่ระดับสีที่ 6 ผลสีม่วง หรือม่วงเข้มจนถึงสีดำ ภายในเปลือกไม่มียางเหลืออยู่ เนื้อและเปลือกสามารถแยกออกจากกันได้ง่าย (นิรนาม, ไม่ระบุ พ.ศ.) ขนาดกลาง น้ำหนัก 85-120 กรัม/ผล แมลงวันทองระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง และหนอนวัยที่ 1 ได้จากแมลงวันทองตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้เป็นจำนวนมากในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียม (artificial diet) สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al., 1973) แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง โดยแต่ละการทดลองมีขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานดังรายละเอียดต่อไปนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> : อุดร และ คณะ (2544 ก) ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันทองในผลมังคุด พบว่า ไข่อายุ 24 ชั่วโมงทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยต่างๆ ขณะที่หนอนวัยที่ 1 ทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 2 และ 3 ในการทดลองนี้ได้ศึกษาเพื่อยืนยันว่าไข่เป็นระยะการเจริญเติบของแมลงวันทองที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างไข่อายุ 24 ชั่วโมงและหนอนวัย ที่ 1 การเตรียมมังคุดให้มีไข่และหนอนวัยที่ 1 อยู่ภายในผล ดำเนินการตามขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติของ อุดร และ คณะ (2544 ก) ใส่ไข่จำนวน 15 ฟอง/ผล หรือหนอนวัยที่ 1 จำนวน 15 ตัว/ผล

ในการทดลองแต่ละครั้งจะเตรียมมังคุดทดลองมีไข่และหนอนวัยที่ 1 อยู่ในผลอย่างละจำนวน 110 ผล จากนั้นแยกอบมังคุดกำจัดไข่และหนอนวันที่ 1 ในเครื่องอบความร้อน โดยจัดเรียงมังคุดจำนวน 60 ผล ในถาดบรรจุผลไม้จำนวน 20 ผล/ถาด สำหรับมังคุดที่เหลืออีกจำนวน 50 ผล ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ต้องผ่านความร้อน อบมังคุดด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ กรรมวิธีที่อากาศร้อนอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นแต่ละระดับภายในช่วงเวลากำหนด (stepped temperature modified vapor heat treatment, STEPPED MVHT) โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลขึ้นถึง 43 °ซ. อากาศร้อนมี

ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงปรับเปลี่ยนเป็นอากาศร้อนที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาเปรียบเทียบความทนทานของแมลงวันทองระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 โดยอบมังคุดให้อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 45 °ซ . และคงความร้อนภายในผลไว้ที่ 45 °ซ . เป็นเวลานาน 1:05, 1:10 และ 1:15 ชั่วโมง

การวัดอุณหภูมิผลมังคุดทดลองอาศัยการวัดจากมังคุดกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 104 ± 2 กรัม/ผล เมื่อมังคุดกำหนดอุณหภูมิจำนวน 2 ผล อุณหภูมิคงอยู่ที่ 45 °ซ. เป็นระยะเวลานานตามกำหนด นำถาดซึ่งบรรจุมังคุดมีไข่และหนอนวัยที่ 1 ในผลอย่างละจำนวน 20 ผล ออกจากเครื่องตู้อบความร้อนและลดอุณหภูมิผลมังคุดทันทีโดยเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model : SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) เก็บมังคุดทดลองตามรายละเอียดใน อุดร และ คณะ (2544 ก) ตรวจผลการทดลองหลังจากอบมังคุด 6 วัน โดยผ่ามังคุดแต่ละผล บันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแมลงโดยใช้สูตรของ Abbott (Abbott, 1925) ดำเนินการทดลองอบมังคุดกำจัดแมลงระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วจำนวน 4 ครั้ง

<u>การทดลองที่ 2</u> : เตรียมมังคุดให้มีไข่อยู่ภายในผลตามขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติที่ได้กล่าวมาแล้ว ใส่ไข่ในผลมังคุดจำนวน 15 ฟอง/ผล ในการทดลองแต่ละครั้งเตรียมมังคุดจำนวน 110 ผล นำมังคุดจำนวน 60 ผล จัดเรียงในถาดบรรจุผลไม้จำนวน 20 ผล/ถาด สำหรับมังคุดที่เหลืออีก 50 ผล ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (control) ไม่ต้องผ่านความร้อน อบมังคุดด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์เหมือนกับในการทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในการกำจัดไข่แมลงวันทองในมังคุดที่อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 45 °ซ. และคงความร้อนภายในผลไว้ที่ 45 °ซ. เป็นเวลานาน 1:25, 1:30, และ 1:35 ชั่วโมง ดำเนินการทดลองอบมังคุดกำจัดแมลงระยะไข่ตามวิธีที่กล่าวมาแล้วจำนวน 7 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การทดลองที่ 1</u> : Table 2 แสดงเวลาในการอบมังคุดให้อุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 45 °ซ. นาน 1:05, 1:10 และ 1:15 ชั่วโมง รวมทั้งรายละเอียดอื่นๆ ในการทดลองอบมังคุดแต่ละครั้ง โดยการ อบมังคุดให้อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 45 °ซ. นั้น มังคุดซึ่งมีแมลงวันทองระยะไข่ในผลใช้เวลาเฉลี่ย 1:48 ชั่วโมง โดยในช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลถึง 43 °ซ . ซึ่งแมลงวันทองระยะไข่อยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ นานเฉลี่ย 1:27 ชั่วโมง ขณะที่ในช่วงเพิ่มอุณหภูมิจาก 43 °ซ. ถึง 45 °ซ. ความชื้นสัมพัทธ์สูงมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ นานเฉลี่ย 0:20 ชั่วโมง (Table 3) สำหรับมังคุดซึ่งมีแมลงวันทอง

ระยะหนอนวัยที่ 1 ในผล ใช้ระยะเวลาในช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิถึง 43 °ซ. นานเฉลี่ย 1:28 ชั่วโมง ขณะที่ในช่วงอุณหภูมิ 43 °ซ. ถึง 45 °ซ. ใช้เวลานานเฉลี่ย 0:21 ชั่วโมง (Table 3) จากผลการทดลองถึงแม้ว่าจะอบมังคุดกำจัดไข่และหนอนวัยที่ 1 แยกกันในเครื่องตู้อบความร้อนคนละเครื่อง แต่ไข่และหนอนวัยที่ 1 อยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันค่อนข้างน้อยมาก

ที่อุณหภูมิผล 45 °ซ. นาน 1:05, 1:10 และ 1:15 ชั่วโมง แมลงวันทองระยะไข่มีอัตราการตายเฉลี่ย 88.10, 94.18 และ 96.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่หนอนวัยที่ 1 มีอัตราการตายเฉลี่ย 97.78, 99.43 และ 99.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 4) ทุกอุณหภูมิกำหนดหนอนวัยที่ 1 มีอัตราการตายเฉลี่ยสูงกว่าระยะไข่ ดังนั้น ระยะไข่จึงมีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาของ อุดร และ คณะ (2544 ก) จากผลการศึกษานี้และของ อุดร และ คณะ (2544 ก) สามารถยืนยันได้ว่าระหว่างระยะไข่และหนอนวัยต่างๆ ของแมลงวันทองที่อาจจะพบทำลายในผลมังคุด ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง มีความทนทานต่อความร้อนกรรมวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มากที่สุด

<u>การทดลองที่ 2</u> : ระยะเวลาที่ใช้ในการอบมังคุดให้อุณหภูมิผลคงอยู่ที่ 45 °ซ. นาน 1:25, 1:30 และ 1:35 ชั่วโมง รวมทั้งน้ำหนักมังคุดกำหนดอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งได้แสดงไว้ใน Table 5 ส่วนระยะเวลาที่มังคุดอยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อน ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงไว้ใน Table 6 ผลการตรวจนับจำนวนแมลงในมังคุดไม่ผ่านความร้อนจากการทดลอง 7 ครั้ง จำนวน 350 ผล มีแมลงรอดชีวิตจำนวน 3,192 ตัว จึงประมาณการได้ว่ามังคุดซึ่งผ่านความร้อนอุณหภูมิ 45 °ซ. แต่ละระยะเวลากำหนด จำนวน 420 ผล จะมีไข่ซึ่งสามารถฟักออกเป็นตัวหนอนได้จำนวนไม่น้อยกว่าประมาณ 3,800 ฟอง ผลการตรวจนับจำนวนแมลงในมังคุดจากการทดลอง 7 ครั้ง ปรากฏว่า ไข่แมลงวันทองในมังคุดตายทั้งหมดเมื่อคงความร้อนภายในสุดผลที่อุณหภูมิ 45 °ซ. เป็นเวลานานตั้งแต่ 1:30 ชั่วโมง ขึ้นไป (Table 7)

ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศร้อนในช่วงเพิ่มอุณหภูมิผลมังคุดถึง 43 °ซ. มีผลกระทบต่อการตายของแมลงโดยตรง ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ในช่วงดังกล่าวนี้เพิ่มสูงขึ้น อัตราการตายของแมลงจะเพิ่มขึ้น (อุดร และ คณะ, 2544 ข) ในการทดลองนี้ได้อบมังคุดภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุดที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมังคุดค่อนข้างน้อย แต่เป็นสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการรอดชีวิตของแมลง การที่ไข่ของแมลงวันทองในผลมังคุดตายทั้งหมดภายใต้สภาพดังกล่าวข้างต้นที่อุณหภูมิ 45 °ซ. เป็นเวลานาน 1:30 ชั่วโมง แสดงว่าที่ระยะเวลานาน 1:30 ชั่วโมง น่าจะเป็นช่วงระยะเวลาสั้นที่สุดที่อุณหภูมิผล 45 °ซ. ซึ่งสามารถกำจัดไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ซึ่งมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงได้ตามมาตรฐานกำหนดและยอมรับเป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช จะขจัดปัญหาด้านกักกันพืชซึ่งเป็นอุปสรรคกีดขวางการ

ส่งออกผลไม้พืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ไปยังประเทศที่ไม่มีแมลงวันผลไม้แพร่ระบาด โดยทั่วไป วิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชต้องมีประสิทธิภาพการกำจัดแมลงสูงมาก ให้ความมั่นใจได้ว่าจะไม่มีแมลงรอดชีวิตเล็ดลอดติดไปกับผลไม้ ไปเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรในประเทศปลายทาง หน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่นกำหนดหลักเกณฑ์สำหรับพิจารณาวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช คือ ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ ระยะเจริญเติบโตที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดจำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ได้ทั้งหมด ขณะที่หน่วยงานกักกันพืชของประเทศสหรัฐอเมริกา กำหนดหลักเกณฑ์ต้องมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงต่ำสุดที่ระดับ 99.9968 เปอร์เซ็นต์ (probit 9) นั้นคือ ให้มีแมลงรอดชีวิตได้ไม่เกินจำนวน 3 ตัว จากจำนวนแมลงที่ผ่านวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชทั้งหมดจำนวน 100,000 ตัว (Baker, 1939) จากข้อมูลผลการวิจัยที่ผ่านมาและผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิผล 45 °ซ. นาน 1:30 ชั่วโมง มีความเป็นไปได้สูงมากที่จะมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงได้ถึงระดับของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช ดังนั้น จึงควรจะได้มีการทดสอบยืนยันกระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวข้างต้นตามขั้นตอนต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ได้ทดลองกำจัดแมลงวันทองระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง และหนอนวัยที่ 1 ในผลมังคุดสามารถยืนยันได้ว่าไข่ทนทานต่อความร้อนมากกว่าหนอนวัยที่ 1 การอบมังคุดด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์โดยคงอุณหภูมิผลไว้ที่ 45 °ซ . นาน 1:30 ชั่วโมง สามารถกำจัดไข่ในผลมังคุดให้ตายทั้งหมด กระบวนการกำจัดแมลงดังกล่าวนี้มีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชเพื่อกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดก่อนส่งออก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้ภายใต้โครงการ “การวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก” สัญญาเลขที่ RDG 4420001

เอกสารอ้างอิง

นิรนาม. (ไม่ระบุ พ .ศ.) ดัชนีแสดงระดับสีของผลมังคุด. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ถนนพหลโยธิน บางเขน กรุงเทพฯ.

อุดร อุณหวุฒิ สลักจิต พานคำ และ พิทวัฒน์ อ่อนทองหลาง . 2544 ก. ความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันทองระยะไข่และหนอนในผลมังคุดต่ออิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์, น. A1-A25. ใน รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

_____. 2544 ข. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตายของไข่แมลงวันทองในผลมังคุด ที่ผ่านการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 1. ความ ชื้นสัมพัทธ์, น. B1-B13. ใน รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับ สนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

_____. 2544 ค. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตายของไข่แมลงวันทองในผลมังคุด ที่ผ่านการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 2. ระยะเวลาให้ความร้อน, น. C1-C11. ใน รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

_____. 2544 ง. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการตายของไข่แมลงวันทองในผลมังคุด ที่ผ่านการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ 3. ขนาดผล, น. D1-D11. ใน รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Baker, A. C. 1939. The basis for treatment of products where fruit flies are involved as a condition for entry into the United States. U.S. Dept. Agr. Circ. 551 : 1-7.

Watanabe, N., F. Ichinohe and M. Sonda. 1973. Improvement of corn flour medium for larval culture of oriental fruit fly. Res. Bull. Plant Prot. Japan. 11: 57-58.

Table 1. Summary of thermal death point of eggs of oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in mangosteens treated with modified vapor heat treatment (MVHT) from previous preliminary disinfestation tests.

RH (%) [1]	Mode of MVHT operation	Cooling method	Temperature and holding time	Reference
50	Stepped-MVHT	Air	45 ^{o} C – 1:15 h	Udorn et al. (2001 a)
			45 ^{o} C – 1:10 h	Udorn et al. (2001 a)
50	Stepped-MVHT	Air	45 ^{o} C – 1:20 h	Udorn et al. (2001 b)
80	Stepped-MVHT	Air	45 ^{o} C – 1:10 h	Udorn et al. (2001 b)
50	Constant-MVHT	Air	45 ^{o} C – 1:20 h	Udorn et al. (2001 c)
50	Stepped-MVHT	Air	45 ^{o} C – 1:20 h	Udorn et al. (2001 c)
50	Stepped-MVHT	Air	45 ^{o} C – 1:20 h	Udorn et al. (2001 c)

[1] Condition of relative humidity when test fruits were exposed to a short dry pre-heating period with hot air from ambient temperature to 43 ^{o} C.

Table 2. Experiment 1 : Time for center of mangosteens to attain 45 ^{o} C for various holding times during modified vapor heat treatment.

Stage	Rep.	Load factor (kg/cum)	Sensor fruit weight (g)	Time (h)		
				1:05	1:10	1:15
Egg	1	18	103.76, 104.48, 104.60	2:54	2:59	3:04
	2	18	103.99, 104.01, 104.07	2:53	2:58	3:03
	3	18	103.79, 104.06, 104.16	2:52	2:57	3:02
	4	18	103.39, 104.33, 104.43	2:53	2:58	3:03
First instar	1	18	103.55, 103.66, 103.77	2:56	3:01	3:06
	2	18	103.11, 103.70, 104.10	2:55	3:00	3:05
	3	18	103.24, 103.28, 104.95	2:58	3:03	3:08
	4	18	103.10, 103.97, 104.13	2:49	2:54	2:59

[1]Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperatures.

Table 3. Experiment 1 : Time for center of mangosteens to attain 45 ^{o} C for various holding times during modified vapor heat treatment.

Stage	Rep.	Time for fruit center to reach 43 ^{o} C (h)[1]	Time for fruit center to reach 45 ^{o} C (h)[1]	Time from 43 to 45 ^{o} C (h)
Egg	1	1:29	1:49	0:20
	2	1:27	1:48	0:21
	3	1:27	1:47	0:20
	4	1:27	1:48	0:21
	Average	1:27	1:48	0:20
First instar	1	1:29	1:51	0:22
	2	1:30	1:50	0:20
	3	1:31	1:53	0:21
	4	1:23	1:44	0:21
	Average	1:28	1:49	0:21

[1] Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperatures.

Table 4. Experiment 1 : Mortality[1] of eggs and first instar larvae of oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in mangosteens treated with modified vapor heat treatment.

Stage	Treatment [2]	Number treated	Number dead	Corrected mortality (%) [3]
Egg	Control	3,000	1,069	00.00
	45 ^{o} C + 1:05 h	3,600	3,327	88.10
	45 ^{o} C + 1:10 h	3,600	3,469	94.18
	45 ^{o} C + 1:15 h	3,600	3,511	96.08
First instar	Control	3,000	268	00.00
	45 ^{o} C + 1:05 h	3,600	3,527	97.78
	45 ^{o} C + 1:10 h	3,600	3,581	99.43
	45 ^{o} C + 1:15 h	3,600	3,596	99.88

[1] Combined data of 4 replicates

[2] Treatment : 60 fruits infested with 15 individuals/fruit.

Control : 50 fruits infested with 15 individuals/fruit.

[3] Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).

Table 5. Experiment 2 : Time for center of mangos teens to attain 45 ^{o} C for various holding times during modified vapor heat treatment.

Rep.	Load factor (kg/cum)	Sensor fruit weight (g)	Time (h)		
			1:25	1:30	1:35
1	18	103.42, 103.57, 104.12	3:12	3:17	3:22
2	18	103.78, 104.63, 104.91	3:13	3:18	3:23
3	18	103.10, 103.55, 104.02	3:12	3:17	3:22
4	18	103.16, 103.58, 104.12	3:13	3:18	3:23
5	18	103.64, 103.92, 104.78	3:11	3:16	3:21
6	18	103.23, 103.29, 103.93	3:10	3:15	3:20
7	18	103.53, 103.70, 104.62	3:17	3:22	3:27

[1] Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperatures.

Table 6. Experiment 2 : Time for center of mangos teens to attain 45 ^{o} C for various holding times during modified vapor heat treatment.

Rep.	Time for fruit center to reach 43 ^{o} C (h)[1]	Time for fruit center to reach 45 ^{o} C (h)[1]	Time from 43 to 45 ^{o} C (h)
1	1:26	1:47	21
2	1:27	1:48	21
3	1:27	1:47	20
4	1:27	1:48	21
5	1:26	1:46	20
6	1:24	1:45	21
7	1:31	1:52	21

[1] Time for center of only 2 sensor fruits to attain target temperatures.

Table 7. Experiment 2 : Mortality[1] of eggs of oriental fruit fly (OFF), *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in mangos teen fruits treated with modified vapor heat treatment.

Treatment [2]	Number treated	Number dead	Corrected mortality (%) [3]
Control	5,250	2,058	0.00
45 ^{o} C + 1:25 h	6,300	6,299	99.97
45 ^{o} C + 1:30 h	6,300	6,300	100.00
45 ^{o} C + 1:35 h	6,300	6,300	100.00

[1] Combined data of 7 replicates.

[2] Treatment : 60 fruits infested with 15 individuals/fruit.

Control : 50 fruits infested with 15 individuals/fruit.

[3] Mortality is corrected by using Abbott's formula (Abbott, 1925).

การศึกษาชนิดของไรศัตรูไม้ผลเพื่อการส่งออก

Study on the Species of Mites as Pests of Exported Fruit Crops

วัฒนา จารณศรี พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์

มานิตา คงชื่นสิน

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ออกทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนไม้ผลเพื่อการส่งออก 5 ชนิด ได้แก่มะม่วง ส้มโอ ลำไย ลิ้นจี่ และมังคุด ระหว่างตุลาคม 2544-กันยายน 2546 ในพื้นที่ ๆ เป็นแหล่งปลูกไม้ผลดังกล่าวในจังหวัดต่าง ๆ รวม 40 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทยโดยเก็บใบ ผลอ่อน และยอดอ่อนของไม้ผลดังกล่าว ที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติอันอาจสงสัยได้ว่า มีสาเหตุเนื่องมาจากการทำลายของไรใส่กล่องพลาสติกใส ซึ่งแช่ในกล่องพลาสติกรักษาความเย็น เพื่อนำกลับมาจำแนกชนิด ในห้องปฏิบัติการ ผลการตรวจจำแนกชนิดของไรทั้งที่เก็บรวบรวมได้และที่ได้รับการจำแนกชนิดไว้เดิมในพิพิธภัณฑ์ พบไรศัตรูมะม่วง ส้มโอ ลำไย ลิ้นจี่ และมังคุด รวมทั้งไรตัวห้ำที่อยู่ร่วมกับไรศัตรูไม้ผลชนิดต่าง ๆ ดังนี้

1. มะม่วง : พบไรรวม 9 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 19 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูมะม่วงจำนวน 4 วงศ์ 8 ชนิด ที่เหลืออีกจำนวนอย่างน้อย 11 ชนิด เป็นไรตัวห้ำ

2. ส้มโอ: พบไรรวม 9 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 25 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูส้มโอรวม 4 วงศ์ 10 ชนิด ที่เหลืออีก 5 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 15 ชนิดเป็นไรตัวห้ำ

3. ลำไย : พบไรรวม 6 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 12 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูลำไยรวม 3 วงศ์ 3ชนิด ที่เหลืออีก 3 วงศ์จำนวนอย่างน้อย 9 ชนิดเป็นไรตัวห้ำ

4. ลิ้นจี่ : พบไรรวม 7 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 13 ชนิดในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูลิ้นจี่รวม 3 วงศ์ 3 ชนิด ที่เหลืออีก 4 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 10 ชนิดเป็นไรตัวห้ำ

5. มังคุด : พบไรรวม 5 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 6 ชนิดในจำนวนนี้เป็นไรศัตรูมังคุดรวม 2 วงศ์ 2 ชนิดที่เหลืออีก 3 วงศ์ จำนวน อย่างน้อย 4 ชนิดเป็นไรตัวห้ำ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06014 001

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม รายได้จากการส่งออกของประเทศส่วนใหญ่มาจากสินค้าเกษตร ในบรรดาสินค้าเกษตรที่ส่งออก ไม้ผลหลายชนิดของประเทศไทยสามารถทำรายได้เข้าประเทศ มีละนับพันล้านบาท ตัวอย่างเช่นในปี 2541 ประเทศไทยมีรายได้จากการส่งออก ทุเรียน มะม่วง ลำไย ลิ้นจี่ และส้มโอ เป็นมูลค่าสูงสุดคือ 2,605,016,000; 201,489,000; 169,405,000; 72,453,000 และ 66,317,000 บาท ตามลำดับ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2542)

จากการเปิดเสรีทางการค้าภายใต้องค์การการค้าโลก ทำให้ประเทศสมาชิกต้องปฏิบัติตามพันธกรณีภายใต้มาตรการด้านสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary) ซึ่งประเทศทั้งหลายนำมาใช้เป็นเครื่องต่อรอง หรือกีดกันทางการค้าในการนำเข้าหรือส่งออกสินค้าเกษตร ด้วยมาตรการ SPS นี้เอง ทำให้ประเทศไทยซึ่งเป็นผู้ส่งออกสินค้าเกษตรหลายชนิด จำเป็นต้องจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชส่งให้ประเทศคู่ค้า เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนพิจารณาตัดสินใจนำเข้าพืชหรือผลผลิตทางการเกษตรจากประเทศไทย นอกจากการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูของพืชที่จะส่งออกแล้ว ประเทศไทยยังต้องหามาตรการในการดำเนินการป้องกัน และกำจัดศัตรูพืชเหล่านี้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค เพื่อสร้างความมั่นใจและการยอมรับให้แก่ประเทศคู่ค้า ที่นำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทยอีกด้วย

ในต่างประเทศข้อมูลเกี่ยวกับไรศัตรูไม้ผลเพื่อการส่งออกเหล่านี้ยังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด เนื่องจากไม้ผลส่วนใหญ่ของประเทศปลูกอยู่ในเขตร้อน และมีผู้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไรศัตรูไม้ผลในภูมิภาคนี้ค่อนข้างน้อย จากการตรวจเอกสารพบว่า ในอินเดียได้มีการรวบรวมรายชื่อไรศัตรูมะม่วงไว้จำนวน 6 ชนิดคือ *Brevipalpus californicus* (Banks), *B. phoenicis* (Geijskes), *Oligonychus coffeae* (Nietner), *O. mangiferus* Rahman and Sapra, *Tetranychus cinnabarinu*s (Boisduval) และ *T. neocalidonychus* Andre และไรศัตรูของลิ้นจี่ไว้จำนวน 3 ชนิดคือ *Oligonychus mangiferus* Rahman and Sapra, *O. punicae* (Hirst) และ *O. biharensis (*Hirst) (Sadana,1985)

สำหรับประเทศไทย เนื่องจากข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของไรศัตรูไม้ผล โดยเฉพาะทุเรียน มะม่วง ลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ และมังคุด ยังอยู่ในลักษณะกระจัดกระจายไม้ผลบางชนิดยังไม่เคยได้มีการสำรวจชนิดของไรศัตรูมาก่อน และข้อมูลที่มีอยู่ก็เป็นการสำรวจ และศึกษาอนุกรมวิธานของไรศัตรูที่ได้ดำเนินการมานานแล้ว เช่น วัฒนาและคณะ(2532) ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานและชีววิทยาของไรศัตรูทุเรียนในประเทศไทย พบไรศัตรูทุเรียนรวม 3 ชนิด คือ *Eutetranychus africanus* (Tucker), *Oligonychus biharensis* (Hirst) และ *Tetranychus fijiensis* Hirst ต่อมาในปี 2534 วัฒนาและคณะได้รายงานผลการศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนส้มโอในประเทศไทย พบไรศัตรูส้มโอรวม 9 ชนิด ในปี 2535 วัฒนาและคณะอีกเช่นกัน ได้ทำการศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนลิ้นจี่ ผล

การศึกษาพบไรศัตรูลิ้นจี่ 3 ชนิด ไรตัวห้ำ 7 ชนิดและในปีเดียวกัน วัฒนาและคณะ (2535) ได้ศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนมะม่วง พบไรศัตรูมะม่วงรวม 8 ชนิด และไรตัวห้ำอีก 11 ชนิด สำหรับมังคุดและลำไยนั้นยังไม่มีรายงานการสำรวจ และเก็บรวบรวมไรศัตรูไม้ผลทั้ง 2 ชนิด นี้อย่างจริงจังมาก่อน

ด้วยเหตุผลและความจำเป็นตามที่ได้กล่าวมาแล้วประเทศไทยในฐานะประเทศผู้ส่งออกไม้ผลทั้ง 5 ชนิดอันได้แก่มะม่วง มังคุด ลำไย ส้มโอ และลิ้นจี่ ต้องจัดเตรียมข้อมูลรายชื่อไรศัตรูไม้ผลเหล่านี้ไว้ให้พร้อมอยู่เสมอ และเป็นปัจจุบัน เพื่อประโยชน์และความสำเร็จในการเจรจากับประเทศคู่ค้าในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไร ได้แก่กล่องพลาสติกใส ขนาดกว้าง X ยาว X สูง = 7.5X2.5x9 นิ้ว , ถุงกระดาษสีน้ำตาล ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ พู่กันเบอร์ 0 ขวดดองตัวอย่างไรขนาด 1 แดรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70 % แว่นขยายกำลังขยาย 20X กล่องพลาสติกรักษาความเย็น ขนาดความจุ 68 ควอทซ์

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ชนิด Stereo microscope เข็มเขี่ยปลายแหลม Slide, Cover glass น้ำยาเมาท์สไลด์ (Hoyer's solution) น้ำยาทาเล็บ ตะเกียงแอลกอฮอล์ เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

3. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการศึกษา ลักษณะทางอนุกรมวิธานของไร ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope พร้อม Key สำหรับใช้ในการจำแนกชนิดของไรศัตรูพืช และไรศัตรูธรรมชาติ

วิธีการ

การศึกษาชนิด (ลักษณะทางอนุกรมวิธาน) ของไร

1. การเก็บตัวอย่างไร : ออกสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไรบนมะม่วง มังคุด ส้มโอ ลิ้นจี่ และลำไยที่ปลูกในพื้นที่จังหวัดต่าง ๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเก็บใบ ผล ช่อดอก ยอดอ่อน และส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ถูกไรทำลายใส่กล่องพลาสติกใส หรือถุงกระดาษสีน้ำตาล พับปากถุงให้ปิดสนิท ซ้อนใส่ลงในถุงพลาสติกขนาดใหญ่รัดปากถุง ก่อนที่จะนำไปแช่ในกล่องพลาสติกรักษาความเย็น ภายในบรรจุแผ่นทำน้ำแข็งไว้ที่ก้นกล่อง เพื่อช่วยให้ตัวอย่างอยู่ในสภาพสด ขณะเดินทางกลับมายังห้องปฏิบัติการ ในบางกรณีที่ไม่สะดวกในการเก็บตัวอย่างสดกลับมายังห้องปฏิบัติการ ก็อาจใช้พู่กันเขี่ยตัวอย่างไรจากส่วนต่าง ๆ ของพืชที่ถูกทำลาย ดองใส่

ในขวดบรรจุแอลกอฮอล์ 70% เพื่อนำกลับมาศึกษาก็ได้ ในบางกรณีอาจต้องใช้แว่นขยายช่วยในการตรวจหาตัวอย่างไรบนส่วนต่าง ๆ ของพืชด้วย

2. การเตรียมตัวอย่างไร : เพื่อศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานนำตัวอย่างที่เก็บได้จากใบ ผล ช่อดอก หรือส่วนต่าง ๆของพืชมาเมาท์ลงบนสไลด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Stereo microscope) โดยใช้ Hoyer' s solution เป็น mounting medium ปิดทับด้วย Cover glass นำขึ้นอังบนตะเกียง เพื่อให้ ระยางค์และส่วนต่าง ๆ ของไรยืดออกเต็มที่ นำตัวอย่างไรบนสไลด์ที่เมาท์แล้วเข้าอบในตู้ หรือเครื่องอุ่นสไลด์อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จึงนำออกมาผนึกขอบ พร้อมบันทึกชื่อพืช สถานที่ วันที่ และชื่อผู้เก็บ ไว้ที่มุมด้านซ้ายของแผ่นสไลด์

3. การจำแนกชนิดของไร : นำตัวอย่างไรบนสไลด์ที่ผ่านการอบเรียบร้อยแล้ว ออกมาตรวจจำแนกชนิดใต้กล้อง compound microscope โดยใช้ key สำหรับจำแนกชนิดจของไรศัตรูพืช ในกรณีพบไรตัวห้ำอยู่ร่วมกับไรศัตรูไม้ผลชนิดต่าง ๆ ก็ทำการตรวจจำแนกชนิดของไรตัวห้ำเหล่านั้นโดยใช้ Key สำหรับจำแนกชนิดของไรตัวห้ำ เช่น Key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรในวงศ์ Phytoseiidae

4. รวบรวมรายชื่อไรศัตรูมะม่วง มังคุด ลำไย ส้มโอ และลิ้นจี่ ทั้งจากตัวอย่างที่เก็บมาได้จากการศึกษาในครั้งนี้และจากตัวอย่างที่มีอยู่เดิมในพิพิธภัณฑ์ เพื่อจัดทำบัญชีรายชื่อไรศัตรูไม้ผลทั้ง 5 ชนิด ที่กล่าวมาแล้ว

เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2544- กันยายน 2546

สถานที่ : 1. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม

2. สวนมะม่วง มังคุด ส้มโอ ลิ้นจี่ และลำไย ในท้องที่ 40 จังหวัดของประเทศไทย คือ

ภาคกลาง : กรุงเทพ ฯ ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสงคราม สระบุรี สมุทรปราการ สมุทรสาคร กาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี ชัยนาท

ภาคเหนือ : เพชรบูรณ์ พิจิตร สุโขทัย อุตรดิตถ์ แพร่ น่าน เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง

ภาคใต้ : ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช พัทลุง ตรัง สงขลา เพชรบุรี ราชบุรี

ภาคตะวันออก : ระยอง ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา จันทบุรี สระแก้ว

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : นครราชสีมา เลย นครพนม สกลนคร ศรีสะเกษ หนองคาย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างไร บนไม้ผลส่งออก 5 ชนิด คือมะม่วง มังคุด ส้มโอ ลิ้นจี่ และลำไย ที่ปลูกในท้องที่ 40 จังหวัด ของภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคใต้ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เพื่อนำตัวอย่างไรบนไม้ผลดังกล่าวกลับมาตรวจจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ พบไรศัตรูบนไม้ผลดังนี้คือ

1. มะม่วง : พบไรศัตรู รวม 4 วงศ์ 8 ชนิด ไรตัวห้ำรวม 5 วงศ์ 11 ชนิด (ตารางที่ 1)
2. มังคุด : พบไรศัตรู รวม 2 วงศ์ 2 ชนิด พบไรตัวห้ำ รวม 3 วงศ์ 4 ชนิด (ตารางที่ 2)
3. ส้มโอ : พบไรศัตรู รวม 4 วงศ์ 10 ชนิด พบไรตัวห้ำ รวม 5 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 15 ชนิด (ตารางที่ 3)
4. ลิ้นจี่ : พบไรศัตรู รวม 3 วงศ์ 3 ชนิด พบไรตัวห้ำ รวม 4 วงศ์ จำนวนอย่างน้อย 10 ชนิด (ตารางที่ 4)
5. ลำไย : พบไรศัตรู รวม 3 วงศ์ 3 ชนิด พบไรตัวห้ำ รวม 3 วงศ์ 9 ชนิด (ตารางที่ 5)

ไรศัตรูที่พบบนไม้ผลชนิดต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะพบทำลายอยู่ที่ใบหรือยอดอ่อน มีเพียงบางชนิดที่ทำลายช่อดอก หรือผล ดังนั้นความสำคัญในแง่ของการกักกันพืช จึงค่อนข้างน้อย เพราะโอกาสที่จะติดใบกับผลผลิตที่ส่งออกเป็นไปได้ยาก อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เป็นไปตามข้อกำหนดหรือมาตรการที่ประเทศสมาชิกองค์การการค้าโลก ต้องปฏิบัติตามในเรื่องของสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช ประเทศไทยในฐานะผู้ส่งออกผลไม้ทั้ง 5 ชนิด ดังกล่าวจำต้องมีรายชื่อไรศัตรูไม้ผลเหล่านี้ไว้เพื่อให้ประเทศผู้รับซื้อใช้ตรวจสอบ และกำหนดมาตรการทางด้านกักกันพืช สำหรับไม้ผลทั้ง 5 ชนิดนี้ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการตรวจจำแนกชนิดของไรศัตรูไม้ผล เพื่อการส่งออก 5 ชนิด คือ มะม่วง มังคุด ส้มโอ ลิ้นจี่ และลำไย ที่เก็บรวบรวมได้จากพื้นที่ปลูกใน 40 จังหวัด ทั่วทุกภาคของประเทศไทย พบไรศัตรูบนไม้ผลต่าง ๆ ดังนี้คือ มะม่วงพบไรศัตรู รวม 4 วงศ์ 8 ชนิด มังคุดพบไรศัตรูรวม 2 วงศ์ 2 ชนิด ส้มโอพบไรศัตรูรวม 4 วงศ์ 10 ชนิด ลิ้นจี่พบไรศัตรูรวม 3 วงศ์ 3 ชนิด และลำไย พบไรศัตรูรวม 3 วงศ์ 3 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

- วัฒนา จารณศรี, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์, มานิตา คงชื่นสิน และฉัตรชัย ศฤงไพบูลย์. 2534. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนส้มโอ. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2534. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 152 – 192.
- วัฒนา จารณศรี, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์, มานิตา คงชื่นสิน และฉัตรชัย ศฤงไพบูลย์. 2535. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนลิ้นจี่ในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2535. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 145 – 165.
- วัฒนา จารณศรี, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์, มานิตา คงชื่นสิน และนวลศรี วงษ์ศิริ. 2532. อนุกรมวิธานและชีววิทยาของไรศัตรูทุเรียนในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2532. กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1 – 25.
- วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และฉัตรชัย ศฤงไพบูลย์. 2535. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนมะม่วงในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2535. กลุ่มงานอนุกรมวิธานและวิจัยไร, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 201 – 233.
- Sadana, G.L. 1985. Plant Feeding Mites of India (Tetranychidae). Kalyani Publishers, Newdelhi, Ludhiana. 99 pp.

ตารางที่ 1 รายชื่อไรที่พบบนมะม่วงในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Tetranychidae[1/]		
- *Oligonychus mangiferus* (Rahman and Sapra)	ใบ (เพสลาด)	กรุงเทพฯ นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี สมุทรสาคร ฉะเชิงเทรา ระยอง จันทบุรี สระแก้ว ชัยนาท สกลนคร ศรีสะเกษ ชุมพร
- *Oligonychus biharensis* (Hirst)	ใบ (เพสลาด)	นครพนม
- *Tetranychus fijiensis* Hirst	ใบ (เพสลาด)	กาญจนบุรี
- *Tetranychus taiwanicus* Ehara	ใบ (เพสลาด)	กาญจนบุรี
วงศ์ Tenuipalpidae [1/]		
- *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)	ใบ (เพสลาด)	นครปฐม
วงศ์ Tarsonemidae		
- *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)	ใบอ่อน	เชียงใหม่ นครราชสีมา
วงศ์ Eriophyidae [1/]		
- *Aceria mangiferae* Sayed	- ตายอดที่จะแตกเป็นใบอ่อน - ตาดอก	กรุงเทพฯ ปทุมธานี ฉะเชิงเทรา ราชบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา สุโขทัย หนองคาย
- *Cisaberoptus kenyae* Keifer	ใบ (เพสลาดและใบแก่)	กรุงเทพฯ ปทุมธานี ปราจีนบุรี จันทบุรี เชียงใหม่ แพร่ สกลนคร นครศรีธรรมราช

ตารางที่ 1. (ต่อ)รายชื่อไรที่พบบนมะม่วงในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Phytoseiidae[2/]		
- *Amblyseius longispinosus* (Evans)	-	จันทบุรี
- *Amblyseius largoensis* (Muma)	-	กรุงเทพฯ นครปฐม ปทุมธานี ราชบุรี
- *Amblyseius nicholsi* Ehara and Lee	-	กาญจนบุรี ราชบุรี
- *Amblyseius phillipsi* McMurtry and Schicha	-	กาญจนบุรี
- *Amblyseius deleoni* Muma and Denmark	-	นครปฐม สุพรรณบุรี จันทบุรี นครศรีธรรมราช
- *Amblyseius syzygii* Gupta	-	กาญจนบุรี
- *Amblyseius cinctus* Corpuz and Rimando	-	สกลนคร นครราชสีมา กาญจนบุรี
วงศ์ Bdellidae [2/]		
Unidentified species	-	ชัยนาท แพร่ เชียงใหม่ นครราชสีมา
วงศ์ Stigmaeidae [2/]		
Agistemus sp.	-	กาญจนบุรี นครศรีธรรมราช น่าน เชียงราย
วงศ์ Cheyletidae [2/]		
Unidentified species	-	กรุงเทพฯ

[1/] **ไรศัตรูมะม่วง**

[2/] **ไรตัวห้ำ**

ตารางที่ 2 รายชื่อไรที่พบบนมังคุดในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Tetranychidae[1/]		
- *Oligonychus coffeae* (Nietner)	ใบ (เพสลาด)	จันทบุรี
วงศ์ Tarsonemidae [1/]		
- *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)	ผลอ่อน	จันทบุรี
วงศ์ Phytoseiidae [2/]	-	จันทบุรี
- *Amblyseius cinctus* Corpuz and Rimando		
- *Amblyseius syzygii* Gupta	-	นครศรีธรรมราช
วงศ์ Cunaxidae [2/]		
- Unidentified species	-	นครศรีธรรมราช
วงศ์ Stigmaeidae [2/]		
- Unidentified species	-	จันทบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช

[1/] **ไรศัตรูมังคุด**

[2/] **ไรตัวห้ำ**

ตารางที่ 3 รายชื่อไรที่พบบนส้มโอในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Tetranychidae[1/]		
- *Eutetranychus africanus* (Tucker)	ใบ (เพสลาด)	นครปฐม ปทุมธานี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ ระยอง ปราจีนบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี นครพนม ชุมพร ตรัง นครศรีธรรมราช
- *Eotetranychus cendanai* Rimando	ใบ, ผลอ่อน	ปทุมธานี นครปฐม ปราจีนบุรี พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย นครศรีธรรมราช
- *Tetranychus fijiensis* Hirst	ใบ (เพสลาด)	สุโขทัย อุตรดิตถ์ เลย ชุมพร นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา
- *Tetranychus taiwanicus* Ehara	ใบ (เพสลาด)	กรุงเทพฯ นครปฐม สมุทรสงคราม ชัยนาท ปราจีนบุรี กาญจนบุรี พิจิตร เลย ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช
- *Tetranychus truncatus* Ehara	ใบ (เพสลาด)	ชัยนาท
- *Acanthonychus jiangfengensis* Wang	ใบ (เพสลาด)	เลย
วงศ์ Tenuipalpidae [1/]		
- *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)	ใบ, ผลอ่อน	ชัยนาท ปราจีนบุรี ระยอง
- *Brevipalpus californicus* (Banks)	ใบ, ผลอ่อน	สมุทรสงคราม ชุมพร นครศรีธรรมราช ตรัง เลย

ตารางที่ 3 (ต่อ) รายชื่อไรที่พบบนส้มโอในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Tarsonemidae [2/]		
- *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)	ใบอ่อน, ผลอ่อน	นครปฐม ปราจีนบุรี ชัยนาท พิจิตร แพร่ ชุมพร นครศรีธรรมราช
วงศ์ Eriophyidae [1/]		
- *Phyllocoptruta oleivora* (Ashmead)	ใบ, ผลอ่อน	นครปฐม สระบุรี สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี ชัยนาท พิจิตร เพชรบูรณ์ สุโขทัย เลย ชุมพร พัทลุง นครศรีธรรมราช
วงศ์ Phytoseiidae [2/]		
- *Amblyseius cinctus* Corpuz and Rimando	-	แพร่ พิจิตร ชัยนาท นครปฐม ชุมพร สุราษฎร์ธานี พัทลุง ปราจีนบุรี ระยอง
- *Amblyseius syzygii* Gupta	-	อุตรดิตถ์ แพร่ เลย ระยอง
- *Amblyseius longispinosus* (Evans)	-	ปทุมธานี นครปฐม ชัยนาท นครศรีธรรมราช
- *Amblyseius deleoni* Muma and Denmark	-	สมุทรสงคราม พัทลุง ตรัง นครศรีธรรมราช
- *Amblyseius paraaerialis* Muma	-	พิจิตร เลย ชัยนาท
- *Amblyseius siamensis* Ehara and Bhandhufalck	-	พัทลุง
- *Amblyseius largoensis* (Muma)	-	ชัยนาท นครปฐม พัทลุง
- *Amblyseius multidentatus* Swirski and Shechter	-	ชัยนาท

ตารางที่ 3 (ต่อ) รายชื่อไรที่พบบนส้มโอในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544 – กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
-*Amblyseius* sp.	-	ชัยนาท
-*Phytoseius hawaiiensis* Prasad	-	นครปฐม ชัยนาท พิจิตร พัทลุง
-*Phytoseius hongkongensis* Swirski and Shechter	-	นครปฐม ชัยนาท
วงศ์ Stigmaeidae [2/]	-	พิจิตร สุโขทัย นครศรีธรรมราช
-*Agistemus* sp.		ปราจีนบุรี ชัยนาท เลย
วงศ์ Cunaxidae [2/]	-	ชุมพร ชัยนาท
-Unidentified species		
วงศ์ Bdellidae [2/]	-	ชุมพร ชัยนาท
- Uenidentified species		
วงศ์ Ascidae [2/]	-	นครปฐม ชุมพร พัทลุง
-Uenidentified species		

[1/] **ไรศัตรูส้มโอ**

[2/] **ไรตัวห้ำ**

ตารางที่ 4 รายชื่อไรที่พบบนลิ้นจี่ในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง กันยายน 2544 – ตุลาคม 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Eriophyidae [1/]	ใบอ่อน, ช่อดอก ผลอ่อน	สมุทรปราการ สมุทรสงคราม
-*Aceria litchii* (Keifer)		นครราชสีมา เพชรบูรณ์
		สุโขทัย น่าน เชียงใหม่ เชียงราย
		กรุงเทพฯ
วงศ์ Tetranychidae [1/]	ใบ (เพสลาด)	น่าน เชียงใหม่ เชียงราย
-*Oligonychus biharensis* Hirst		จันทบุรี กรุงเทพ ฯ นครพนม
		หนองคาย
วงศ์ Tenuipalpidae [1/]	ใบ (เพสลาด)	เชียงใหม่
-*Brevipalpus phoenicis* (Geijskes)		
วงศ์ Phytoseiidae [2/]	-	
-*Amblyseius nicholsi* Ehara and Lee	-	นครราชสีมา
-*Amblyseius deleoni* Muma and	-	สมุทรสงคราม
Denmark		
-*Amblyseius paraaerialis* Muma	-	เชียงใหม่
-*Amblyseius syzygii* Gupta	-	เชียงราย
-*Amblyseius peltatus* Van der Merwee	-	-
-*Amblyseius asiaticus* Evans	-	สกลนคร
-*Phytoseius hawaiiensis* Prasad	-	เชียงใหม่
วงศ์ Cleyletidae [2/]	-	
-Unidentified species		จันทบุรี
วงศ์ Bdellidae [2/]	-	
-Unidentified species		น่าน ปากช่อง สกลนคร
		สมุทรปราการ จันทบุรี
วงศ์ Stigmaeidae [2/]	-	
-Unidentified species		เชียงราย จันทบุรี

[1/] **ไรศัตรูลิ้นจี่**

[2/] **ไรตัวห้ำ**

ตารางที่ 5. รายชื่อไรที่พบบนลำไยในประเทศไทย (รวบรวมระหว่าง ตุลาคม 2544- กันยายน 2546)

วงศ์/ชนิดของไร	ส่วนของพืชที่ไรทำลาย	เขตแพร่กระจาย
วงศ์ Tetranychidae [1/]	ใบ (เพสลาด)	พิจิตร เพชรบูรณ์ ลำพูน
-*Oligonychus biharensis* (Hirst)		เชียงใหม่
วงศ์ Tenuipalpidae [1/]	ใบ (เพสลาด)	ลำพูน
Brevipalpus phoenicis (Geijskes)		
วงศ์ Eriophyidae [1/]	ใบอ่อน ช่อดอก	พิจิตร เพชรบูรณ์ ลำพูน
Aceria longana Boczek and Knihinicki		เชียงใหม่
วงศ์ Phytoseiidae [2/]	-	
Amblyseius nicholsi Ehara and Lee		กาญจนบุรี
Amblyseius phillipsi Me Murtry and Schicha		พิจิตร
Amblyseius paraaerialis (Muma)		พิจิตร เชียงใหม่
Amblyseius cinctus Corpuz and Rimando	-	น่าน ลำพูน สุพรรณบุรี
Amblyseius syzygii Gupta	-	พิจิตร แพร่
Phytoseius hawaiiensis Prasad	-	เชียงใหม่ ลำพูน สุพรรณบุรี
Typhlodromus wdibu Pritchard and Baker	-	นครราชสีมา
วงศ์ Stigmaeidae[2/]		
-*Agistemus* sp.	-	เพชรบูรณ์ แพร่ เชียงใหม่ นครราชสีมา
วงศ์ Cunaxidae[2/]		
Unidentified species	-	เชียงใหม่

[1/] **ไรศัตรูลำไย**

[2/] **ไรตัวห้ำ**

การศึกษาชีววิทยาและการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูไม้ผล 5 ชนิด (ลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุด มะม่วง) เพื่อการทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชในไม้ผลส่งออก

Studies on Biolology and Control of Insect Pests for Pest List of Export Fruit Crop (Litchi, Longan, Pammelo, Mangosteen,and Mango)

เกรียงไกร จำเริญมา วิทย์ นามเรืองศรี
สราญจิต ไกรฤกษ์ บุษบง มนัสมั่นคง
อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาในแหล่งปลูกลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุด และมะม่วง ระหว่างเดือนตุลาคม 2544 ถึงเดือนกันยายน 2546 โดยการเก็บรวบรวมแมลงศัตรูชนิดต่างๆ ที่ลงทำลายลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุด และมะม่วง ทุกชนิด พร้อมบันทึกลักษณะการทำลายของแมลงชนิดต่างๆ นำแมลงศัตรูที่เก็บได้มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 28 ^{0}C ความชื้น 80% RH เพื่อศึกษาชีวประวัติ ชนิดละ 20 ตัว ดังนี้

ลิ้นจี่และลำไย

แมลงศัตรูที่ทำการศึกษา คือ มวนลำไย (*Tessaratoma papillosa* Drury) หนอนเจาะขั้วผล (*Conopmorpha sinensis* Bradley) หนอนคืบกินใบ (*Oxyodes scrobiculta* Fabricius) หนอนชอนใบ (*Conopmorpha lichiella* Bradley) และเพลี้ยหอย (*Drepanococcus chiton* (Geen)) ที่สำคัญคือ หนอนเจาะขั้วผล ระบาดรุนแรงในลิ้นจี่ และมีปัญหาการปนเปื้อนไปกับผลผลิต สามารถป้องกันกำจัดโดยเก็บรวบรวมผลที่ร่วง และดักแด้ตามใบทำลาย และควรพ่นสารฆ่าแมลง cyfluthrin, carbaryl หรือ chlopyrifos/cypermethrin ส่วนลำไย เพลี้ยหอย คือปัญหาสำคัญ ควรป้องกันกำจัดในระยะตัวอ่อนโดยพ่น Petroleum spray oil หรือ chlopyrifos หรือ malathion

ส้มโอ

แมลงศัตรูที่ทำการศึกษา คือ หนอนชอนใบส้ม (*Phyllocnistis citrella* Stainton) เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) หนอนเจาะผล (*Citripestis sagittiferella* Moore) หนอนฝีดาษ (*Prays* sp.) และหนอนแก้วส้ม (*Papilio demoleus malayanus* Walloce) ที่สำคัญคือ หนอนเจาะผล ทำลายโดย

รหัสทะเบียนวิจัย 45 06 011 027

แม่ผีเสื้อวางไข่เป็นกลุ่มที่ผลอายุประมาณ 45 วัน เมื่อฟักเป็นหนอนจะเจาะเข้าไปกัดกินภายในผล ซึ่งมีอาการยางไหล จากนั้นผลจะเน่าและร่วงหล่น วิธีที่ดีในการป้องกันการทำลายคือ การห่อผลตั้งแต่ผลอายุประมาณ 40 วัน

มังคุด

แมลงศัตรูที่ศึกษาคือ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) หนอนชอนใบ (*Phyllocnistis* sp.) และหนอนกินใบอ่อน (*Stictoptera cucullioides* Guenee) ที่สำคัญคือ เพลี้ยไฟทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัย จะดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบอ่อน ดอก และผลอ่อน ทำให้ผลมีผิวเปลือก หยาบกร้าน ขรุขระ และขายได้ในราคาต่ำ สามารถป้องกันกำจัดโดยการพ่นสารฆ่าแมลง 3 ครั้ง ในระยะก่อนดอกบาน 7 วัน ขณะดอกบานและหลังดอกบาน 7 วัน โดยใช้ fipronil, imidacloprid, carbosulfan หรือ chlopyrifos/cypermethrin อย่างใดอย่างหนึ่งโดยพ่นสลับกัน เพื่อป้องกันการสร้างความต้านทานสารเคมีของเพลี้ยไฟ ในมังคุดแมลงศัตรูที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบ คือ เพลี้ยแป้ง *Pseudococcus cryptus* ซึ่งได้ศึกษาชีวประวัติและการป้องกันกำจัดพบสารที่ให้ผลดีในการป้องกันกำจัด คือ chlopyrifos 40% EC และ chlopyrifos/cypermethrin 50%/5% EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

มะม่วง

แมลงศัตรูที่ศึกษา คือ เพลี้ยไฟพริก (*Scirtothrips dorsalis* Hood) หนอนผีเสื้อเจาะผลมะม่วง (*Noorda albizonalis* Hampton) และด้วงงวงกัดใบมะม่วง (*Deporaus marginatus Pascoe*) โดยเฉพาะเพลี้ยจักจั่นมะม่วง (*Idioscopus niveosparsus* (Lethierry)) ทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากยอดอ่อน ใบ และช่อดอก ทำให้ไม่ติดผล สามารถป้องกันกำจัดได้โดยการตัดแต่งกิ่งลดความหนาแน่นของทรงพุ่มและควรพ่นสารฆ่าแมลงlambda cyhalothrin

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม รายได้จากการส่งออกของประเทศส่วนใหญ่มาจากสินค้าเกษตร โดยเฉพาะสินค้าพืช ทุเรียน มังคุด ลำไย ลิ้นจี่ มะม่วง ฝรั่ง สับปะรด ส้มโอ และมะขามหวาน จากการเปิดเสรีทางการค้า ทำให้ประเทศไทยในฐานะประเทศสมาชิกองค์การค้าโลก (World Trade Organization) ต้องปฏิบัติตามกฎเกณฑ์เกี่ยวกับการค้าสินค้าเกษตร ภายใต้ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการด้านสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary Measure หรือ SPS) ซึ่งมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2538 (FAO, 1996)

การบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยพืช ทำให้ประเทศกำลังพัฒนาต้องประสบความยากลำบากเพราะต้องเผชิญกับการแข่งขันด้านธุรกิจเกษตรกับประเทศที่พัฒนาแล้ว ซึ่งมีประสบการณ์มากกว่า และมีเทคโนโลยีการผลิตที่ดีกว่าทุกประการ แต่กฎเกณฑ์ภายใต้ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชก็ระบุไว้ชัดเจนว่า ประเทศสมาชิกมีสิทธิและพันธกรณีพื้นฐาน (right and obligation) ใน

การกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช เพื่อป้องกันศัตรูพืชจากต่างประเทศมิให้เข้าไปเป็นอันตรายหรือเกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม วิธีการปฏิบัติคือประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืช โดยการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (PRA : Pest Risk analysis) ซึ่งอาจจะเป็นโรคพืช แมลง ศัตรู และวัชพืช ชนิดใดชนิดหนึ่งซึ่งอาจจะติดมากับสินค้าเกษตรที่นำเข้า

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประเทศผู้นำเข้า จะดำเนินการได้จะต้องมีการร้องขอบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและข้อมูลด้านศัตรูพืชแต่ละชนิดของสินค้าเกษตรนั้น ๆ ซึ่งประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรจะต้องเป็นผู้จัดทำ หากประเทศผู้ส่งออกไม่มีบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและข้อมูลศัตรูพืชที่พร้อมหรือครบถ้วนตามความต้องการของผู้นำเข้า ก็จะทำให้การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชไม่อาจกระทำได้ นำไปสู่การกีดกันทางการค้า โดยไม่ได้รับอนุญาตให้นำเข้าสินค้าเกษตรนั้น ๆ เช่น อุปสรรคในการส่งลำไยสดจากประเทศไทยไปสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีการร้องขอให้ประเทศไทยส่งบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของลำไย เพื่อให้องค์กรที่มีหน้าที่จัดทำการประเมินความเสี่ยงของศัตรูพืช คือ Animal and Plant Inspection Service (APHIS) ได้พิจารณาดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชมาก่อนหรือกรณีความล่าช้าของการส่งออกทุเรียนไปออสเตรเลีย ก็เนื่องจากประเทศไทยไม่มีบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและข้อมูลศัตรูพืชแต่ละชนิดอย่างถูกต้องชัดเจน ทำให้ต้องมีการสืบค้นข้อมูลและทบทวนรายละเอียดที่ผู้นำเข้าต้องการเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงและกำหนดมาตการต่าง ๆ เพื่อการอนุญาตนำเข้าทุเรียน (Australian Quarantine and Inspection Service, 2000) ฉะนั้นหากประเทศผู้ส่งออกมีการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชในสินค้าส่งออกที่มีศักยภาพไว้อย่างครบถ้วนถูกต้องตามหลักวิทยาศาสตร์ อุปสรรคทางการค้าสินค้าเกษตรก็จะหมดไปบังเกิดผลดีต่อธุรกิจเกษตรของประเทศไทยด้วย

ผลไม้ที่มีศักยภาพของประเทศไทยตามที่ได้กล่าวมาแล้ว มีศัตรูพืชที่สำคัญทั้ง โรค แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และวัชพืช ซึ่งต้องมีการเร่งรัดงานวิจัยและพัฒนา เพื่อแก้ปัญหาศัตรูพืชเหล่านั้น พร้อมๆ ไปกับการวิจัย เพื่อรวบรวมชนิดศัตรูพืช (โรค แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และวัชพืช) อันเป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลส่งให้ประเทศผู้นำเข้าเมื่อมีการร้องขอ ซึ่งจะช่วยให้เกิดความสะดวก และรวดเร็วในการเจรจาต่อรองทางการค้ากับประเทศคู่ค้าเดิม และเป็นการเพิ่มโอกาสในการเปิดตลาดการค้ากับประเทศผู้นำเข้ารายอื่นๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สวนลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุด มะม่วง
2. กรงเลี้ยงแมลงขนาด 40x40x40 เซนติเมตร และ ขนาด 20x25x10 เซนติเมตร
3. สารฆ่าแมลง เช่น lambda - cyhalothrin (Karate 2.5% EC), cyfluthrin (Boythroid10% EC), carbosulfan (Posse 20% EC), carbaryl (Sevin 85% WP)
4. สารชีวินทรีย์กำจัดแมลง (แบคทีเรีย, ไวรัส และไส้เดือนฝอย)

5. สารสกัดจากธรรมชาติ (สารสกัดสะเดา และน้ำมันปิโตรเลียม)
6. เครื่องพ่นสารฆ่าแมลงชนิดแรงดันน้ำสูง
7. กล้องจุลทรรศ์
8. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงแมลง
9. อุปกรณ์ตวงวัดและอุปกรณ์ที่จำเป็นอื่นๆ

วิธีการ

<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาชีววิทยาของแมลงศัตรูไม้ผลชนิด 5 ชนิด คือ ลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุด และมะม่วง

โดยเก็บรวบรวมแมลงศัตรูที่พบลงทำลายลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุดและมะม่วง ทุกชนิด พร้อมบันทึกลักษณะการทำลายของแมลงแต่ละชนิด นำแมลงที่เก็บได้มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C ความชื้น 80% RH เพื่อศึกษาชีวประวัติ ชนิดละประมาณ 30 ตัวในกล่องพลาสติกขนาด 8x10x5 เซนติเมตร กล่องละ 1 ตัว บันทึกการพัฒนาของแมลงที่ศึกษาทุกระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย ถ้าเป็นตัวหนอน บันทึกการลอกคราบและวัดความกว้างของกะโหลกศีรษะ จับคู่ตัวเต็มวัยเลี้ยงในกรงขนาด 30x30x30 เซนติเมตร กรงละ 1 คู่ ตรวจนับปริมาณไข่ และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ ส่งตัวเต็มวัยจำแนกชนิดที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลง และสารสกัดธรรมชาติเพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูไม้ผล 5 ชนิด วางแผนการทดลอง แบบ RCB มี 3 - 4 ซ้ำ 7 - 9 กรรมวิธี (ชนิดของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงศัตรูในแต่ละพืช) ดังนี้

1. พ่น fipronil (Ascend 5% SC) อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร
2. พ่น chlorpyrifos (Lorsban 40% EC) อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร
3. พ่น chlorpyrifos/cypermethrin (Nurelle L $_{505}$ EC) อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร
4. พ่น carbaryl (Sevin 85% WP) อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
5. พ่น imidachloprid (Confidor 10% SL) อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร
6. พ่น petroleum oil (SK 99 83.9% EC) อัตรา 100 มล./น้ำ 20 ลิตร
7. พ่นน้ำเปล่า

ศึกษาในสวนขนาด 1 - 2 ไร่ เมื่อพบแมลงศัตรูลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ มังคุดและมะม่วง ระบาด พ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง และสารสกัดจากธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการพ่นน้ำเปล่าตามกรรมวิธีดังกล่าว ตรวจโดยใช้พืชซ้ำละ 1 ต้น ตรวจนับปริมาณแมลงศัตรูแต่ละชนิดทุกวัย ก่อนพ่นสาร โดยการสุ่มที่ยอดอ่อน ดอก ผลอ่อน หรือผลแก่ ต้นละ 10 ตัวอย่าง และสุ่มตรวจนับเช่นเดิมหลังการพ่นสาร 1,3 และ 7 วัน นำไปเปรียบเทียบทางสถิติต่อไป

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2545 - กันยายน 2546 ที่สวนเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย จันทบุรี นครราชสีมา สุพรรณบุรี นครปฐม ชัยนาท สมุทรสงคราม

ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี และห้องปฏิบัติการกองกีฏและสัตววิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> ศึกษาชีววิทยาของแมลงศัตรูในไม้ผล 5 ชนิด

จากการศึกษาระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2546 ในไม้ผล 5 ชนิด ตามแหล่งปลูกต่างๆ พบแมลงศัตรูดังนี้

ลิ้นจี่ พบแมลงศัตรู 9 ชนิด คือ หนอนม้วนใบ *Archips micaceara* หนอนชอนใบ *Conopmorpha lichiella* Bradley หนอนเจาะขั้วผล *C. sinensis* Bradley หนอนเจาะผล *Deudorix epijarbas* แมลงค่อมทอง *Hypomesa squasmosus* ผีเสื้อมวนหวาน *Orthreis fullonia* มวนลำไย *Tessaratoma papillosa* Drury เพลี้ยไฟพริก *scirtothrip dorsalis* และ หนอนกาแฟสีแดง *Zeuzera coffeae* (ตารางที่ 1) ในจำนวนนี้แมลงศัตรูที่มีความสำคัญ ทำความเสียหายแก่ลิ้นจี่เป็นจำนวนมาก ได้แก่ หนอนเจาะขั้วผล มีวงจรชีวิต ดังนี้

ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืนที่มีขนาดเล็ก สีน้ำตาลปนเทา เมื่อกางปีกกว้าง 12.0 - 15.2 มิลลิเมตร ยาว 6.0 - 7.0 มิลลิเมตร มีลวดลายซิกแซ็กบนปีก ปลายปีกสีน้ำตาลปนเหลือง ปีกคู่หลังคล้ายขนนกสีเทาเงิน หนวดสีเงิน มีความยาวมากกว่าลำตัวและปีก

ไข่ วางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ บนผล ลักษณะกลมรี สีเหลืองอ่อน ระยะไข่ 2.5 - 3.5 วัน เพศเมียวางไข่ได้ 2 - 331 ฟอง

หนอน เมื่อฟักจากไข่ใหม่ๆ มีลำตัวยาวประมาณ 1.0 มิลลิเมตร สีขาวนวล กะโหลกสีน้ำตาล มี 3 วัย ระยะหนอนแต่ละวัย ใช้เวลา 4.3, 5.7, และ 5.3 วัน ตามลำดับ หนอนวัยสุดท้ายจะเจาะออกมาจากผลและชักใย เข้าดักแด้ที่ใบ

ดักแด้ ก่อนเข้าดักแด้หนอนจะชักใยห่อหุ้มตัวเองอยู่ภายใน ขนาดดักแด้กว้าง 1.0 ยาว 7.1 มิลลิเมตร ระยะดักแด้ 7 - 8 วัน

<u>ลำไย</u> พบแมลงศัตรู 10 ชนิด ได้แก่ หนอนม้วนใบ *Archips micaceara* หนอนชอนใบ *Conopmorpha lichiella* Bradley หนอนเจาะขั้วผล *C. sinensis* Bradley หนอนเจาะผล *Deudorix epijarbas* แมลงค่อมทอง *Hypomesa squasmosus* หนอนร่าน *Parasa lepida* ผีเสื้อมวนหวาน *Orthreis fullonia* มวนลำไย *Tessaratoma papillosa* Drury เพลี้ยไฟพริก *scirtothrip dorsalis* และ หนอนกาแฟสีแดง *Zeuzera coffeae* (ตารางที่ 2) ซึ่งแมลงศัตรูที่สำคัญได้แก่ หนอนเจาะขั้วผล เช่นกัน

<u>ส้มโอ</u> พบแมลงศัตรู 6 ชนิด ได้แก่ หนอนชอนใบ *Phyllocnistis citrella* เพลี้ยไฟพริก *scirtothrip dorsalis* หนอนเจาะผลส้ม *Citripestis sagittiferella* หนอนฝีดาษ *Prays sp.* หนอนแก้วส้ม *Papillio*

demoleus malayanus และผีเสื้อมวนหวาน *Orthreis fullonia* (ตารางที่ 3) แมลงศัตรูที่สำคัญ ได้แก่ หนอนเจาะผลส้มโอ เนื่องจากเมื่อเข้าทำลายจะทำให้ผลเน่าเสียและร่วงหล่น มีวงจรชีวิตดังนี้

ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืนขนาดกลาง เมื่อกางปีกกว้าง 2.5 - 2.7 เซนติเมตร ปีกคู่หน้าสีเทาปนน้ำตาล ปีกคู่หลังสีขาวนวล

ไข่ แม่ผีเสื้อวางไข่ที่ผลเป็นกลุ่มๆ ละ 2 - 19 ฟอง ไข่มีลักษณะกลมแบน สีขาวใสเป็นเงา ระยะไข่ 4 - 5 วัน

หนอน เมื่อฟักจากไข่จะเจาะเข้าในผล ระยะแรกหนอนมีสีส้มอมชมพู และเปลี่ยนเป็นสีชมพูเข้ม หนอนจะกัดกินอยู่ภายในผลส้ม จนกระทั่งโตเต็มที่ทำให้ผลส้มเน่าและร่วงหล่น พบการทำลายตั้งแต่ผลอายุประมาณ 45 วัน ระยะหนอน 9 - 13 วัน

ดักแด้ เมื่อหนอนโตเต็มที่จะเจาะออกจากผลเพื่อเข้าดักแด้ในดิน และเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป

<u>มังคุด</u> พบแมลงศัตรู 10 ชนิด คือ หนอนชอนใบ *Phyllocnistis sp.*และ *Acrocercops sp.*หนอนกินใบอ่อน *Stictoptera cucullioides* และ *S. signifera* หนอนม้วนใบ *Archips micaceana* ผีเสื้อมวนหวาน *Orthreis fullonia* เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrip dorsalis* เพลี้ยไฟมังคุด *S. oligochaetus* เพลี้ยแป้ง *Pseudococcus cryptus* และ *Dysmicoccus neobrevipes* (ตารางที่ 4) แมลงศัตรูที่มีความสำคัญได้แก่ เพลี้ยแป้ง *Pseudococcus cryptus* เมื่อเลี้ยงด้วยผลฟักทอง มีวงจรชีวิตดังนี้

ตัวเต็มวัย รูปร่างไข่กว้าง 2.2 ยาว 3.6 มิลลิเมตร ผนังลำตัวสีเหลืองอ่อน ปกคลุมด้วยไขแป้งสีขาว โดยเฉพาะด้านข้างของลำตัวมีเส้นแป้งล้อมรอบ โดยเส้นแป้งที่อยู่ตรงปล้องท้ายของลำตัว จะมีขนาดยาวเท่าเส้นแป้งที่ปล้องอื่นๆ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะเริ่มสร้างไข่ โดยสร้างเส้นใยสีขาวฟูใต้ลำตัวและเริ่มวางไข่ไว้ในเส้นใยใต้ลำตัว ทำให้เห็นส่วนหลังโค้งนูนคล้ายหลังเต่า ตัวเมียแต่ละตัววางไข่ได้เฉลี่ย 374 ฟอง ตัวเต็มวัยมีอายุ 9 - 14 วัน

ระยะไข่ มีลักษณะกลมรี สีเหลืองใส กว้าง 0.2 ยาว 0.32 มิลลิเมตร เมื่อใกล้ฟักจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและเห็นจุดแดงซึ่งเป็นส่วนตารวม 2 จุด ระยะไข่ใช้เวลา 3.05 วัน จึงฟักเป็นตัวอ่อน เดินออกมาจากใต้ท้องตัวแม่

ตัวอ่อนวัยที่ 1 ตัวอ่อนที่ฟักจากไข่ใหม่ๆ มีสีเหลืองใส รูปร่างยาว หัวป้านท้ายแหลม เห็นส่วนหนวดและขาชัดเจน ตารวมสีแดง ขนาดกว้าง 0.39 มิลลิเมตร ยังไม่พบไขแป้งตามลำตัว เคลื่อนไหวได้ว่องไว กว่าวัยอื่นๆ โดยจะเดินไปหาตำแหน่งที่เหมาะสม เพื่อเกาะฝังตัวดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชอาหาร เรียกตัวอ่อนในวัยนี้ว่า crawler ใช้เวลาเฉลี่ย 4.50 วัน

ตัวอ่อนวัยที่ 2 ตัวอ่อนวัยแรกจะลอกคราบโดยเกิดรอยแตกที่ส่วนหัว จากนั้นตัวอ่อนจะดันตัวออกมาจากรอยแตกกลายเป็นตัวอ่อนวัยที่ 2 มีลำตัวยาวรีสีขาวขุ่น ตามบริเวณลำตัวเริ่มมีผงแป้ง โดยเฉพาะส่วนท้ายของลำตัวจะพบเส้น 2 เส้น เพลี้ยแป้งวัยนี้มีการเคลื่อนที่อยู่บ้างแต่จะเคลื่อนที่น้อยกว่าตัวอ่อนในวัย

แรก และเป็นการเคลื่อนที่เพื่อเปลี่ยนตำแหน่ง เพื่อดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชอาหาร ขนาดลำตัวกว้าง 0.64 ยาว 1.07 มิลลิเมตร ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 5.35 วัน

ตัวอ่อนวัยที่ 3 ตัวอ่อนวัยที่ 2 จะลอกคราบโดยวิธีเดียวกับตัวอ่อนวัยแรก ตัวอ่อนวัยที่ 3 มีการสร้างไขแป้งสีขาวเพิ่ม โดยเฉพาะเห็นเส้นไขแป้งโดยรอบลำตัวและขุยแป้งปกคลุม ทั่วลำตัวจนเห็นสีขาวทั่วลำตัว ตัวอ่อนเพศผู้และเพศเมียวัยนี้จะมีขนาดรูปร่างแตกต่างกัน ในการเลี้ยงด้วยฟักทองครั้งนี้พบเฉพาะเพศเมีย วัยนี้มีขนาด 1.40 ยาว 2.51 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่จะเกาะฝังตัวนิ่งในตำแหน่งที่เหมาะสมของพืชอาหารดูดกินน้ำเลี้ยงและถ่ายมูลหวานเป็นหยดๆ อยู่ท้ายของลำตัว ใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 6.80 วัน จึงลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยเพศเมีย

สรุปเพลี้ยแป้ง *Pseudococcus cryptus* เมื่อเลี้ยงเดี่ยวๆ ด้วยผลฟักทอง จะพบเฉพาะเพศเมียโดยตัวอ่อนมี 3 วัย ใช้เวลา13 - 19 วัน ตัวเต็มวัยใช้เวลา9 - 14 วัน รวมตลอดอายุขัย23 - 31 วัน ตัวเมียแต่ละตัววางไข่ 142 - 460 ฟอง ระยะไข่เฉลี่ย3.05 วัน

<u>มะม่วง</u> พบแมลงศัตรู 8 ชนิด คือ เพลี้ยไฟพริก *Scirtothrip dorsalis* เพลี้ยจักจั่นมะม่วง *Idioscopus clypealis* เพลี้ยจักจั่นฝอย *Amrasca splendens* หนอนผีเสื้อเจาะผลมะม่วง *Noorda albizonalis* หนอนแมลงวันกินดอกมะม่วง *Dasyneura mangiferae* แมลงค่อมทอง *Hypomeces squamosus* ด้วงงวงกัดใบมะม่วง *Deposaus manginatus* และแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* (ตารางที่ 5) แมลงศัตรูที่สำคัญ คือ แมลงวันผลไม้ มีวงจรชีวิตดังนี้

ตัวเต็มวัย เป็นแมลงขนาดเล็ก ส่วนหัว อก และท้องมีสีน้ำตาลอ่อน สันหลังอกสีเหลืองทอง เมื่อกางปีกกว้าง 15 มิลลิเมตร หลังการผสมพันธุ์เพศเมียจะวางไข่โดยใช้อวัยวะวางไข่แทงลงใต้ผิวผลไม้ ตัวเมียแต่ละตัววางไข่ได้ประมาณ 1,300 ฟอง

ไข่ ไข่จะถูกวางลงใต้ผิวของผลไม้ เป็นกลุ่มๆ ลักษณะยาวรี คล้ายผลกล้วยหอม ระยะไข่ใช้เวลา 2 - 4 วัน

ตัวอ่อน ตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้เป็นหนอนแมลงวันเมื่อฟักใหม่ๆ สีขาวใส หัวแหลมท้ายป้าน หนอนโตเต็มที่มีขนาด 8.0 - 10.0 มิลลิเมตร ระยะหนอนประมาณ 7 - 8 วัน เมื่อโตเต็มที่หนอนจะดีดตัวออกจากผลไม้ เพื่อออกไปเข้าดักแด้ในดิน

ระยะดักแด้ ดักแด้แมลงวันผลไม้มีรูปร่างคล้ายถังเบียร์เมื่อเข้าดักแด้ใหม่ ๆ มีสีขาวนวลหรือเหลืองอ่อน จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ระยะดักแด้ 7 - 9 วัน

<u>การทดลองที่ 2</u> ศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูสำคัญบางชนิด ระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2547 ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดแมลงกับเพลี้ยแป้งในมังคุด พบ หลังพ่น 1 วัน สารที่ให้ผลดี คือ chlorpyrifos 40% EC และ chlorpyrifos/cypermethrin 50% /5% EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พบเพลี้ยแป้งเฉลี่ย 0.50 และ 0.60 ตัวต่อผล ตามลำดับ รองลงมาคือการพ่นด้วย imidacloprid 10% SL petroleum oil 83.9% EC และ fipronil 5% SC อัตรา 10, 100 และ 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ พบเพลี้ยแป้ง 1.10, 1.20,และ 1.37 ตัวต่อผล ตามลำดับ ขณะที่พ่นน้ำเปล่า

พบเพลี้ยแป้ง 1.93 ตัวต่อผล หลังพ่น 5 วัน สารที่ให้ผลดีที่สุดคือ chlorpyrifos 40% EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พบเพลี้ยแป้ง 0.03 ตัวต่อผล รองลงมาคือ การพ่นด้วย chlorpyrifos/cypermethrin 50% /5% EC และ petroleum oil 83.9% EC อัตรา 30 และ 100 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร พบเพลี้ยแป้ง 0.27 และ 0.37 ตัวต่อผล ตามลำดับ ขณะที่พ่นน้ำเปล่า พบเพลี้ยแป้งเฉลี่ย 1.77 ตัวต่อผล หลังพ่น 7 วัน พบ ทุกกรรมวิธีที่พ่นสารให้ผลในการป้องกันกำจัดดี พบเพลี้ยแป้งเฉลี่ย 0.03 - 0.37 ตัวต่อผล น้อยกว่าและแตกต่าง 4.07 ตัวต่อผล (ตารางที่ 6) จึงสรุปได้ว่า สารที่ให้ผลดีในการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งในมังคุดคือ chlorpyrifos 40% EC และ chlorpyrifos/cypermethrin 50%/5% EC อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของแมลงศัตรูลิ้นจี่ที่สำรวจพบในแหล่งปลูกลิ้นจี่ภาคเหนือ ระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2546

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
Archips micaceana	leaf roller	ใบ
Conopomorpha litchiella	leaf miner	ใบอ่อน
Concmorpha sinensis	fruit borer	ผล
Deudorix epijarbas	fruit borer	ผล
Hypomeces squamosus	green weevil	ใบ
Orthreis fullonia	fruit piercing moth	ผล
Scirtothrips dorsalis	chilli thrips	ดอก
Tessaratoma papillosa	longan stink bug	ใบ,ดอก,ผล
Zeuzera coffeae	red coffee borer	กิ่ง

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของแมลงศัตรูลำไยที่สำรวจพบในแหล่งปลูกลำไยภาคเหนือ ระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2546

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
Archips micaceana	leaf roller	ใบ
Conopomorpha litchiella	leaf miner	ใบอ่อน
Concmorpha sinensis	fruit borer	ผล
Deudorix epijarbas	fruit borer	ผล
Hypomeces squamosus	green weevil	ใบ
Parasa lepida	slug caterpillar	ใบ
Orthreis fullonia	fruit piercing moth	ผล
Scirtothrips dorsalis	chilli thrips	ดอก
Tessaratoma papillosa	longan stink bug	ใบ,ดอก,ผล
Zeuzera coffeae	red coffee borer	กิ่ง

ตารางที่ 3 แสดงชนิดของแมลงศัตรูส้มโอที่สำรวจพบในแหล่งปลูกส้มโอภาคกลาง ระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2546

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
Phyllocnistis citrella	citrus leaf miner	ใบ
Scirtothrips dorsalis	chilli thrips	ดอก, ใบ, ผล
Citripestis sagittiferella	citrus fruit borer	ผล
Prays sp.	citrus rind borer	ผล
Papillio demoleus malayanus	leaf eating caterpillar	ใบ
Orthreis fullonia	fruit piercing moth	ผล

ตารางที่ 4 แสดงชนิดของแมลงศัตรูมังคุดที่สำรวจพบในแหล่งปลูกมังคุดภาคตะวันออก ระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2546

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
Phyllocnistis sp.	leaf miner	ใบอ่อน
Acrocercops sp.	leaf miner	ใบอ่อน
Stictoptera cucullioides	leaf eating caterpilla	ใบอ่อน
Stictoptera signifera	leaf eating caterpilla	ใบอ่อน
Archips miceana	leaf roller	ใบอ่อน
Orthreis fullonia	fruit piercing moth	ผล
Scirtothrips dorsalis	chilli thrips	ใบอ่อน ผลอ่อน
Scirtothrips oligochaetus	mangosteen thrips	ใบอ่อน ผลอ่อน
Pseudococcus cryptus	citrus mealybug	ผล
Dysmicoccus nuobrevipes	grey pineapple mealybug	ผล

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของแมลงศัตรูมะม่วงที่สำรวจพบในแหล่งปลูกมะม่วงภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ระหว่างตุลาคม 2545 - กันยายน 2546

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย
Scirtothrips dorsalis	chilli thrips	ใบอ่อน, ดอก, ผล
Idioscopus clypealis	mango jassid	ใบอ่อน, ช่อดอก
Amrasca aplendens	-	ใบอ่อน, ช่อดอก
Nooda albizonalis	mango seed borer	ผล
Dasymeura mangiferae	mango blossom feeder	ดอก
Hypomeces sguamosus	green weevil	ใบ
Deposaus margimatus	mango leaf cutter	ใบอ่อน
Bactrocera dorsalis	oriental fruit fly	ผล

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนเฉลี่ยของเพลี้ยแป้งบนผลมังคุดก่อนและหลังพ่นสารป้องกันกำจัดชนิดต่างๆ ในสวนเกษตรกร อำเภอขลุง จังหวัดจันทบุรี (มกราคม 2546)

สารฆ่าแมลง	อัตราใช้ กรัม ,มล./น้ำ 20 ลิตร	จำนวนเพลี้ยแป้งเฉลี่ย (ตัว/ผล) 1/			
		ก่อนพ่น	หลังพ่น 1 วัน	หลังพ่น 5 วัน	หลังพ่น 7 วัน
fipronil 5% SC	10	2.10	1.37b	0.60b	0.37a
chlorpyrifos 40% EC	30	3.13	0.50a	0.03a	0.03a
chlorpyrifos/cypermethrin 50%/5% EC	30	2.60	0.60a	0.27ab	0.07a
carbaryl 85% WP	50	2.63	1.57bc	0.46b	0.30a
imidacloprid 10% SL	10	3.20	1.10b	0.50b	0.13a
petroleum oil 83.9% EC	100	2.47	1.20b	0.37ab	0.27a
น้ำเปล่า	-	2.63	1.93c	1.77c	4.07b
c.v. (%)		35.50	23.50	13.01	23.82

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำๆ ละ 10 ผล

การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัดไรลำไย

Some Acaricides Efficacy Trial for Controlling Longan Mite *Aceria dimocarpi* (Kuang) in Longan

พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เลือกต้นลำไยขนาดอายุ 8-10 ปี ที่มีอาการถูกทำลายโดยไรลำไย จำนวน 12 ต้น แบ่งทรงพุ่มของต้นลำไยที่เลือกไว้ออกเป็น 2 ส่วน สุ่มเลือกกิ่งที่มีอาการทำลายของไรลำไยในแต่ละส่วนแล้วทำเครื่องหมายไว้นับจำนวนยอดที่แสดงอาการ หลังจากนั้นฉีดพ่นสารฆ่าไร คือ wettable sulfur อัตรา 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อีกส่วนไม่ฉีดพ่นสาร โดยพ่นสารทุก 15 วัน ทำการตรวจนับจำนวนยอดที่ถูกทำลาย และยอดสมบูรณ์ ทุกเดือน เริ่มฉีดพ่นในเดือนมิถุนายน 2546 พบว่า ในเดือน กรกฎาคม 2546 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อาการฟุ่มไม้กวาดในยอดใหม่ของส่วนที่ฉีดพ่นสารคือ 74.96 และส่วนที่ไม่พ่นสารคือ 58.86 ในเดือน สิงหาคม พบว่า ส่วนที่พ่นสารมีค่าเฉลี่ยคือ 66.74 และส่วนที่ไม่พ่นสารคือ 81.58 ในเดือน กันยายน พบว่า ส่วนที่พ่นสารมีค่าเฉลี่ยคือ 83.32 และส่วนที่ไม่พ่นสารคือ 82.43 ซึ่งค่าเฉลี่ยที่ได้นั้นยังมีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน จึงยังหาข้อสรุปไม่ได้

คำนำ

ลำไย เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ทำรายได้ให้เกษตรกรผู้ปลูกเป็นอย่างดี โดยเฉพาะเกษตรกรในภาคเหนือ ผลผลิตลำไยสามารถส่งออกได้ทุกรูปแบบ ทั้งผลสด แช่แข็ง หรือ แปรรูป เป็นลำไยแห้ง ซึ่งมีมูลค่าในการส่งออก สูง ในปี 2545 มูลค่าส่งออกลำไยทั้งผลสด แช่แข็ง ลำไยแห้ง รวมกันประมาณ 3312.94 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547)

การผลิตลำไยให้ได้คุณภาพดี เป็นที่ต้องการของตลาดส่งออก การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูลำไยก็มีความสำคัญ เพราะเมื่อเกิดการระบาดแล้วจะทำให้ต้นลำไยทรุดโทรม อ่อนแอ และอาจตาย

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 46 06 014 002

ได้ จริยา และคณะ 2545 ได้รวบรวมแมลงศัตรูลำไยที่พบในภาคเหนือของประเทศไทย โดยแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ คือ ระยะแตกใบอ่อนมีแมลงศัตรู ถึง 29 ชนิด ซึ่งไรลำไย *Aceria dimocarpi* (Kuang) ก็นับเป็นศัตรูสำคัญชนิดหนึ่ง โดยทำให้ช่อใบที่แตกออกมาใหม่ม้วนหงิกแตกพุ่มไม้กวาด ใบอ่อนมีขนาดเล็ก ทำให้ยอดอ่อนเสียหายมากถึง 50 % ส่งผลกระทบต่อผลผลิต จึงควรหาวิธีป้องกันกำจัดที่มีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

สวนลำไยอายุประมาณ 8-15 ปี
สารฆ่าไร wettable sulfur 80% wg และสารจับใบ
เครื่องพ่นสารฆ่าแมลงแบบแรงดันน้ำสูง
ถุงกระดาษเก็บตัวอย่างผล
กล้องจุลทรรศน์
อุปกรณ์บันทึกข้อมูล

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ทำการทดลองในสวนลำไย อ .ห้างฉัตร จ .ลำปาง เลือกต้นลำไยขนาดอายุ 8-15 ปี ที่มีอาการถูกทำลายโดยไรลำไย โดยสังเกตที่ยอดแตกใหม่จะมีอาการม้วนหงิก และ แตกเป็นพุ่มไม้กวาด แบ่งทรงพุ่มของต้นลำไยที่เลือกไว้ออกเป็น 2 ส่วน สุ่มเลือกกิ่งที่มีอาการทำลายของไรลำไยในแต่ละส่วนแล้วทำเครื่องหมายไว้ นับจำนวนยอดที่แสดงอาการ หลังจากนั้นฉีดพ่นสารฆ่าไร wettable sulfur 2.8 % a.i และกรรมวิธีที่ไม่ฉีดพ่นสาร โดยฉีดพ่นสารทุกสัปดาห์ หลังจากนั้น ตรวจนับจำนวนยอดที่แตกใหม่ บันทึกยอดแตกใหม่ที่แสดงอาการทำลายของไรลำไย นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติต่อไป

ผลการทดลอง

เริ่มฉีดพ่นในเดือนมิถุนายน 2546 พบว่า ในเดือน กรกฎาคม 2546 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ อาการพุ่มไม้กวาดในยอดใหม่ ของส่วนที่ฉีดพ่นสารคือ 74.96 และส่วนที่ไม่พ่นสารคือ 58.86 ในเดือน สิงหาคม พบว่า ส่วนที่พ่นสารมีค่าเฉลี่ยคือ 66.74 และส่วนที่ไม่พ่นสารคือ 81.58 ในเดือน กันยายน พบว่า ส่วนที่พ่นสารมีค่าเฉลี่ยคือ 83.32 และส่วนที่ไม่พ่นสารคือ 82.43 ซึ่งค่าเฉลี่ยที่ได้นั้นยังมีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน แล้วหยุดทำการทดลอง

สรุป

ยังไม่สามารถสรุปได้เพราะข้อมูลที่ได้น้อยเกินไป และการทดลองต้องหยุดลงในปีงบ ประมาณถัดไป

เอกสารอ้างอิง

จริยา วิสิทธิ์พานิช , ชาตรี สิทธิกุล และ เยาวลักษณ์ ทันทร์บาง . 2545. โรคและแมลงศัตรูลำไย ลิ้นจี่ และมะม่วง. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. สามเสนใน พญาไท กรุงเทพฯ. 296 หน้า

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2548. ปริมาณและมูลค่าส่งออกสินค้าเกษตรรายเดือน : ลำไยสด แช่แข็ง , ลำไยแห้ง จาก http://www.oae.go.th/statistic/export/1301LOD.xls

การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัดไรขาวในมังคุด

Some Acaricides Efficacy Trial for Controlling Broad Mite *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) in Mangosteen

พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์
วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าไรในการป้องกันกำจัดไรขาวในมังคุด ในเดือนกุมภาพันธ์ 2545 ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้น โดยใช้สารฆ่าไรเพียง 3 ชนิด คือ abamectin อัตรา 25 มล./น้ำ 20 ลิตร , amitraz อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร และกำมะถันผง อัตรา 70 กรัม/น้ำ 20 ลิตร เปรียบเทียบกับการไม่พ่นสาร พบว่า amitraz อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร มีแนวโน้มให้ผลดีในการควบคุมไรขาวศัตรูทำลายผลมังคุดอ่อน เนื่องด้วยในปี 2546 ที่ผ่านมานี้ ไม่พบการระบาดของไรขาวบนมังคุดในสวนเกษตรกรมากพอที่จะสามารถทำการทดลองได้ เนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสมทำให้มังคุดออกดอกล่าไปจากเดิม ซึ่ง เข้าในช่วงฤดูแล้งที่ไม่เหมาะสมต่อการระบาดของไรขาว

คำนำ

มังคุดเป็นไม้ผลที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากมีรสชาติที่ดี รูปทรงและสีสันสวยงามจนได้รับการขนานนามว่า Queen of Fruit ในการปลูกมังคุดเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ต้องมีการดูแลรักษาที่ดี ตลอดจนต้องมีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ดี มักพบศัตรูพืชเข้าทำลายมังคุดในระยะต่าง ๆ คือ ระยะใบอ่อน ดอก และ ระยะผลอ่อน (เกรียงไกร.,2542)

ไรขาว *Polyphagotarsonemus latus* Banks เป็นศัตรูพืชอีกชนิดหนึ่ง เข้าทำลายมังคุดในระยะผลอ่อน ทั้งตัวอ่อนและตัวแก่ดูดน้ำเลี้ยงทำลายผลมังคุดอ่อนที่เพิ่งเริ่มติดผล โดยจะหลบซ่อนตัวอยู่ภายใต้ กลีบเลี้ยงที่ขั้วผล และจะพบมากกับผลที่อยู่ภายในทรงพุ่ม ผิวของผลอ่อนที่ถูกทำลายจะค่อย ๆ เปลี่ยน

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 46 06 014 001

เป็นสีน้ำตาลอ่อน และมีสีเข้มขึ้น เมื่อการทำลายรุนแรงมากผิวของผลอ่อนจะมีลักษณะด้านสาก ไม่เขียวเป็นมันเหมือนผลอ่อนปกติ และเมื่อผลพัฒนาเป็นผลแก่ ผิวของผลจะด้าน ไม่เป็นมัน ผลผลิตไม่ได้คุณภาพ ไม่เป็นที่ต้องการของตลาดส่งออก จึงควรทดสอบหาสารป้องกันกำจัดไรขาวที่มีประสิทธิภาพ และปลอดภัย เพื่อการผลิตมังคุดที่มีคุณภาพในการส่งออก

วิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. สวนมังคุดอายุประมาณ 8-10 ปี
2. สารฆ่าไร ได้แก่
    - abamectin (Jacket 1.8% EC)
    - amitraz (Mitac 20 % EC)
    - กำมะถันผง (Cumulus DF 80% WG)
3. เครื่องพ่นสารฆ่าแมลงแบบแรงดันน้ำสูง
4. ถุงกระดาษเก็บตัวอย่างผล
5. กล้องจุลทรรศน์
6. อุปกรณ์บันทึกข้อมูล

วิธีการ

ทำการทดลองในเดือนกุมภาพันธ์ 2545โดยเลือกต้นมังคุดขนาดอายุ 8-10 ปี ใช้ต้นมังคุด 1 ต้น/ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 ซ้ำ พ่นสารฆ่าไร 3 ชนิด ได้แก่ abamectin อัตรา 25 มล./น้ำ 20 ลิตร , amitraz อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร และกำมะถันผง อัตรา 70 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และ กรรมวิธีที่ 4 ไม่ฉีดพ่นสาร โดยสุ่มนับผลมังคุดอ่อน จำนวน 20 ผล/ซ้ำ บันทึก จำนวนไรที่พบใต้กลีบเลี้ยงของผลมังคุด ก่อนฉีดพ่นสารฆ่าไร และ หลังพ่นสารฆ่าไรที่ 1, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ทำการตรวจนับจำนวนไร และ ไรตัวห้ำที่พบ โดยตรวจนับเฉพาะตัวที่เคลื่อนไหว (Active Stage) แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกรรมวิธีต่อไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ก่อนพ่นสารทำการตรวจนับปริมาณไรขาวที่พบบนผลอ่อนมังคุด อายุประมาณ 1-2 สัปดาห์ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย abamectin และ amitraz มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผลเท่ากับ 45.6 และ 47.4 ตามลำดับแตกต่างกับ กรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย กำมะถันผง และ ไม่พ่นสาร มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผล เท่ากับ32.5 และ 25.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ที่ 1วันหลังการพ่นสารพบว่า กรรมวิธีพ่นสารทุกกรรมวิธี มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผลเท่ากับ 16.68, 8.92 และ 24.3 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่พ่นสาร ที่มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผลเท่ากับ 44 และกรรมวิธีพ่นสาร amitraz แตกต่างกับกรรมวิธีพ่น กำมะถันผง กรรมวิธีพ่น abamectin นั้นไม่แตกต่างกับกรรมวิธีพ่นสาร amitraz และ กรรมวิธีพ่น กำมะถันผง

ที่ 5 วันหลังการพ่นสาร พบว่า ทุกกรรมวิธีพ่นสาร ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผล เท่ากับ 1.72, 1.56 และ 4.9 ตามลำดับ แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ที่มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผล เท่ากับ 20.44

ที่ 7 วันหลังการพ่นสาร ทุกกรรมวิธีพ่นสาร ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยของไรขาว ต่อผล เท่ากับ 2.28, 0.88 และ 7.74 ตามลำดับแต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ที่มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผล เท่ากับ 19.96

ที่ 14 วันหลังการพ่นสาร ทุกกรรมวิธีพ่นสาร ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยของไรขาว ต่อผล เท่ากับ 0, 0 และ 0.38 ตามลำดับแต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ที่มีค่าเฉลี่ยของไรขาวต่อผล เท่ากับ 6.3

จะเห็นได้ว่า เมื่อเวลาผ่านไป จำนวนไรขาวที่พบบนผลมังคุดเริ่มลดจำนวนลง เพราะไรขาวจะเข้าทำลายผลอ่อน เมื่อผลพัฒนาแก่ขึ้นไรขาวก็ไม่สามารถทำลายผลได้ ฉะนั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของไรขาวคือช่วงตั้งแต่ติดผล จนผลอ่อนอายุไม่เกิน 5 สัปดาห์ จึงควรทำการป้องกันกำจัดไรขาวในช่วงเวลาดังกล่าวเพื่อให้ได้ผลมังคุดที่มีคุณภาพ

ส่วนในปีถัดมา ไม่พบการระบาดของไรขาวบนมังคุดในสวนเกษตรกรมากพอที่จะสามารถทำการทดลองได้ เนื่องจากสภาพอากาศไม่เหมาะสมทำให้มังคุดออกดอกล่าไปจากเดิม ซึ่งปกติจะเริ่มออกดอกในช่วงเดือน พฤศจิกายน -ธันวาคม แต่ในปีนี้มังคุดเริ่มออกดอกในเดือน กุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นฤดูแล้งซึ่งไม่เหมาะสมต่อการระบาดของไรขาว จึงไม่สามารถทำการทดสอบได้

สรุป

จากการทดสอบสารป้องกันกำจัดไรขาวบนผลมังคุดอ่อนเบื้องต้น พบว่า สารที่ใช้ทุกชนิดมีผลในการป้องกันกำจัดไรขาวบนผลมังคุดอ่อนได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยเฉพาะสาร amitraz ซึ่งให้ผลในการป้องกันกำจัดได้สูงสุด แต่การทดสอบทำได้เพียง 1 ครั้ง ยังต้องทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง และมีการเพิ่มกรรมวิธีเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองอีกครั้งหนึ่ง สิ่งสำคัญในการป้องกันกำจัดไรขาวบนผลมังคุด คือ ช่วงเวลาที่จะฉีดพ่นสาร ควรทำการฉีดพ่นสารตั้งแต่มังคุดเริ่มออกดอก จน ผลอายุมากกว่า 1 เดือน

ตารางที่ 1 จำนวนไรขาวเฉลี่ยบนผลมังคุดอ่อนในแต่ละกรรมวิธีของการทดลอง

กรรมวิธี	ก่อนพ่น	1 DAT	5 DAT	7 DAT	14 DAT
abamectin .009%	45.62b	16.68ab	1.72a	2.28a	0a
amitraz 0.05%	47.40b	8.92a	1.56a	0.88a	0a
กำมะถันผง 0.28 %	32.56a	24.3b	4.90a	7.74a	0.38a
ไม่พ่นสาร	25.52a	44.02c	20.44b	19.96b	6.3b
CV	22.8%	35.1%	95.4%	70.8%	90.2%
RE		56.7%	59.2%	56.7%	57%

ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างในทางสถิติที่ระดับความชื่อมั่น 95 % โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

เอกสารอ้างอิง

เกรียงไกร จำเริญมา. 2542 ก. แมลงศัตรูมังคุด. หน้า 18-30. *ใน* แมลงศัตรูไม้ผล. เอกสาร วิชาการ กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผลสมุนไพรและเครื่องเทศ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ชีววิทยา การแพร่กระจายและการป้องกันกำจัดหอยทากและทาก ในไม้ผลส่งออก

Biology, Distribution and the Control of Land Snails and Slugs of Fruit Tree

ชมพูนุท จรรยาเพศ **ปราสาททอง พรหมเกิด**

ธีรเดช เจริญรักษ์ **เสริมศักดิ์ หงส์นาค** **ปิยาณี หนูกาพ**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

สำรวจชนิดของหอยทากที่พบในสวนไม้ผลส่งออก 5 ชนิดได้แก่มังคุด มะม่วง ส้มโอและส้มเขียวหวาน ลิ้นจี่ ลำไยจากการสำรวจในสวนมังคุด พบหอยทาก 15 ชนิด สวนลำไย พบหอยทาก 4 ชนิด สวนลิ้นจี่ พบหอยทาก 6 ชนิด สวนส้มโอ พบ 7 ชนิด สวนมะม่วงพบ 5 ชนิด หอยทากที่สำรวจพบเหล่านี้เป็นหอยทากที่เป็นศัตรูพืช รวม 8 ชนิด ได้แก่ หอยทากสาริกา (*Sarika obesior*) หอยทากยักษ์อาฟริกา (*Achatina fulica* Bowdich) หอยดักดาน (*Cryptozona siamensis*) ทากฟ้า (*Semperula siamensis*) ทาก (*Parmarion* sp.) หอยเจดีย์ใหญ่ (*Prosopeas walkeri*) หอยเลขหนึ่ง (*Ovachlamys fulgens*) และหอยเจดีย์เล็ก (*Lamellaxis gracilis*) ซึ่งพบหอยดักดานในสวนมังคุด ลำไยและ ลิ้นจี่มีประชากรสูงกว่าหอยชนิดอื่น ในสวนส้มโอพบหอยทาก *Pseudobuliminus siamensis* มีประชากรสูงกว่าชนิดอื่นคือ 60.71 % สวนมะม่วงพบหอยทากสาริกามีประชากรสูงกว่าชนิดอื่น คือ 65.87 % และมีความหนาแน่น 8.24 ตัว/ตารางเมตร นอกนั้นได้แก่ หอยดักดาน 0.90 % ทาก Parmarion 16.01 % และหอยเจดีย์ใหญ่ 17.21 % การศึกษายังไม่เสร็จสิ้นเนื่องจาก กรมฯให้หยุดปฏิบัติงาน

คำนำ

หอยทากบก (Land snail) อยู่ใน class gastropoda (stomach-foot) และอยู่ใน subclass Pulmonata เช่นเดียวกับทาก (Land slug) ซึ่ง Kerney และ Camerons (1987) อธิบายลักษณะไว้ว่าลำตัวของหอยทากและทากเหมือนกันตรงที่มีความอ่อนนิ่มและเปียกชื้นปกคลุมด้วยเมือก (mucous/slime) Gordon (1994) กล่าวว่ามันชอบอาศัยอยู่ในแหล่งที่มีความชื้นสูง มีไม้ใบปกคลุมผิวดินเพราะใช้เป็นที่หลบอาศัยจากแสงแดด มีความชื้นสัมพันธ์ในอากาศไม่ต่ำกว่า 60% สวนผลไม้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะอากาศและบรรยากาศดังที่กล่าวมาแล้ว อาจเนื่องจากในบริเวณนั้นเคยเป็นป่าดงดิบที่มีซากใบไม้ทับถมเป็น humus เมื่อมาปรับปรุงปลูกไม้ผล หรือจัดทำเป็นสวนผลไม้ที่ไม่ได้มีการจัดการที่ดี จึงยังคงมีวัชพืชขึ้นรก ก็ย่อมเป็นแหล่งอาศัยหอยทากต่อเนื่องมาได้

ทะเบียนวิจัย 45 06 012 007

ทากและหอยทากมักหลีกเลี่ยงสภาพอากาศที่แห้งแล้ง ดังนั้นจึงออกหากินในเวลากลางคืน หรือเมื่ออากาศชื้นภายหลังฝนตก หอยทากบางชนิดไต่ขึ้นบนส่วนต่าง ๆ ของต้นไม้ หรือบนก้อนหิน หรือบางทีอาจไต่ขึ้นสูงมากเพื่อกิน lichens และ algae ที่อยู่ตามผิวลำต้นไม้ใหญ่ เช่น หอยขมิ้น *Amphidromus* spp. ที่มักพบบนต้นมังคุดทางภาคใต้และต้นเงาะในภาคตะวันออก รวมทั้งหอยทาก *Leptopoma* spp. และอื่น ๆ อีกหลายต่อหลายชนิด แต่หอยทากเหล่านี้ไม่ใช่ศัตรูพืช (ชมพูนุทและคณะ, 2537) แม้ว่าบางชนิด เช่น *Austenia doisuthepensis* ซึ่ง Solem, 1966 ได้แจ้งไว้ว่ามีพบในประเทศไทย ส่วนใหญ่อยู่ในป่า แต่ก็พบมากในสวนลางสาดในจังหวัดปราจีนบุรีด้วยเช่นกัน โดยไม่ได้กัดทำลายลางสาดแต่ทำความเดือดร้อนให้เกษตรกร เพราะการที่มีประชากรหอยอยู่รวมกันมาก จะดูเหมือนเป็นการรบกวนพืชนั้น ๆ หรือพืชในบริเวณนั้นทำให้แลดูสกปรก เนื่องจากซากหอยตายและเมือกตามทางเดินของหอย ดังนั้น จึงควรมีการสำรวจชนิดและการศึกษาด้านชีววิทยาบางประการของหอยทากที่พบในสวนผลไม้ โดยเฉพาะไม้ผลส่งออกต่างประเทศ ได้แก่ มังคุด , ส้มโอ, ลิ้นจี่, ลำไย และมะม่วง เพราะแม้ว่าจะไม่พบว่าเป็นศัตรูพืชดังที่กล่าวมาแล้ว แต่ตัวอ่อน (juvemile) หรือไข่ของมันซึ่งมีขนาดเล็ก รวมทั้งเยื่อเมือก อาจจะติดไปกับไม้ผลส่งออกไปต่างประเทศก็ได้ ทั้งนี้การศึกษานี้จะทำให้ได้บัญชีรายชื่อศัตรูพืช (pest list) เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (PRA- Pest List Analysis) ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope
2. เวอร์เนีย คาลิปเปอร์
3. แว่นขยาย (Hand lens)
4. Alcohol 80%
5. กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ
6. ตาข่ายไนล่อน, มุ้งลวด
7. ดินขุยไผ่, ขุยมะพร้าว
8. ตู้กระจก

วิธีการ

ศึกษาการแพร่กระจายและจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน ปฏิบัติการทดลองโดยเก็บรวบรวมบันทึกภาพลักษณะการทำลายพืช ทากและหอยทากจากสวนมะม่วง ส้มโอ ลิ้นจี่ ลำไย มังคุด ในจังหวัดต่าง ๆ โดยแบ่งเป็นภาคเหนือ , ใต้, กลาง, ตะวันตก, ตะวันออก และตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคละ 3 จังหวัด

โดยเฉพาะสวนที่มีความชุ่มชื้นมาก หรือในระยะฤดูฝน แล้วจัดทำแผนที่การแพร่กระจายของทากและหอยทากแต่ละชนิด ทั้งนี้ โดยศึกษาการจำแนกชนิด และตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยทากที่เก็บรวบรวมได้ และจัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่หอยที่เป็นศัตรูพืช และกลุ่มหอยที่ไม่เป็นศัตรูพืช

ศึกษาชีววิทยา การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ การกินอาหารของกลุ่มหอยทากที่พบว่าเป็นศัตรูพืชไม้ผลทั้ง 5 ชนิดนั้น โดยนำหอยทากเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ศึกษาวงจรชีวิต โดยให้ผสมพันธุ์ แล้วออกไข่จนเจริญเป็นตัวเต็มวัย สามารถสืบพันธุ์ได้

ศึกษาการป้องกันกำจัดหอยทากศัตรูพืช โดยทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าหอย (molluscicide) ต่าง ๆ กับหอยทากนั้น ๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ สาร metaldehyde (Dead meal 4% pellete, Anglo slug, Snail bait) เป็นต้น

ศึกษาการป้องกันกำจัดหอยทากและไข่หรือตัวอ่อนที่จะติดไปกับไม้ผลส่งออก

เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2544 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2547

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจหอยทาก (Land snail) และทาก (Slug) ในสวนไม้ผล 5 ชนิด พบหอยต่างๆ ดังนี้

	เป็นศัตรูพืช	ไม่เป็นศัตรูพืช
ส้มโอ (พิจิตร)	1.*Cryptozona siamensis* (Pleiffer) 2.*Sarika obesior* (Martens) 3.*Semperula siamensis* (Martens) 4.*Lamelllaxis gracilis* (Hutton) 5.*Achatina fulica* (Bowdich) 6.*Ovachlamys fulgens* (Gude)	7.*Pseudobuliminus siamemsis* (Redfield)
มะม่วง (ลำปาง,ลำพูน)	1.*Lamellaris gracilis* (Hutton) 2.*Semperula siamensis* (Martens) 3.*Succinea* sp. 4.*Prosopeas walkeri* (Benson) 5.*Sarika obesior* (Martens)	
ลิ้นจี่ (เชียงราย)	1.*Cryptozona siamensis* (Pleiffer)	6. *Ovachlamys fulgens* (Gude)

	2. *Lamelllaxis gracilis* 3.*Parmarion* sp. 4.*Sarika obesior* 5.*Semperula*	
ลำไย (เชียงใหม่)	1. *Cryptozona siamensis* (Pleiffer) 2. *Parmarion pupullaris* 3. *Prosopeas walkeri* (Benson) 4.*Sarika obesior* (Martens)	
มังคุด (จันทบุรี)	1.*Achatina fulica* (Bowdich) 2. *Sarika obesior* (Martens) 3. *Cryptozona siamensis* (Pleiffer) 4.slug สีน้ำตาลอ่อนเหลือง 5.*Semperula siamensis* (Martens)	6.*Amphidromus artricallosus* (Goula) 7.*Rhiostoma housii* (Haines) 8.*Cyclophorus fuguratus* (Pfeiffer) 9.*Pseudobuliminus siamensis* (Redfield) 10.*Hemiplecta distincta* (Pfeiffer) 11.*Succinea* sp. ชนิดใหม่ 12.หอยเจดีย์สีชมพู

<u>ด้านการศึกษาชีววิทยา</u> ได้มีการศึกษาเฉพาะข้อมูลเบื้องต้นเท่านั้น ดังนี้

<u>หอยทากสาริกา</u> *Sarika obesior* (Martens) : Helicarionidae

รูปร่างกลมค่อนข้างแบน เปลือกบาง สีน้ำตาลเข้มเป็นเงา เนื้อหอยสีเข้มเกือบดำ ไม่มีฝา (operculum) ปิด วางไข่เป็นเม็ด สีขาวขุ่นและนิ่ม ครั้งละ 20 - 30 ฟอง ตามพื้นดินหรือใต้ใบไม้ร่วงบนพื้นดิน ไข่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15.0 x 14.3 มิลลิเมตร จำนวนวงเปลือก (whole) 5 3/8

<u>หอยเจดีย์ใหญ่</u> *Prosopeas walkeri* (Benson) : Subulinidae

รูปร่างมียอดแหลมเรียว สูง 15-24 ม.ม. 8 -10 whole ผิวเปลือกเป็นเงา มีขีดเล็กๆขวางไปทั่วๆ ปากเป็นรูปไข่คล้ายกับหอยเจดีย์เล็ก ไม่มีฝาปิด ออกไข่ตามพื้นดิน ครั้งละ 8-10 ฟอง ลักษณะกลมขนาด 0.3 มิลลิเมตร

<u>ทากฟ้า</u> *Semperula siamensis* (Martens) : Veronicellidae

เป็นทาก (slug) ไม่มีเปลือกแข็ง ขนาดยาว 70-90 มิลลิเมตร กว้าง 20 มิลลิเมตร ลำตัวอ่อนนิ่มและเปียกชื้น เนื่องจากไม่มีเปลือกให้หลบความร้อนและแห้งแล้งจึงมักซุกอยู่ตามผิวดินหรือใต้ที่กำบังต่างๆ สีน้ำตาลเข้ม ด้านท้องสีเหลืองอ่อน ส่วน foot แคบเป็นแถบยาวอยู่ด้านท้องตรงกลางลำตัว กว้าง 2 มิลลิเมตร ไข่เป็นสีน้ำตาลอ่อน ใส อาจรวมเป็นก้อนกลมประมาณ 30-40 ฟอง อยู่ในหลุมตื้นๆ ตามพื้นดินระหว่างฟอง มีสายโปรตีนเชื่อมต่อกัน ฟักภายใน 7-10 วัน

หอยเจดีย์เล็ก *Lamellanis gracilis* (Hutton) : Subulinidae

รูปร่างขนาดเล็ก 9-10 มิลลิเมตร เปลือกเรียว สูงขึ้นไปมียอดแหลม ไม่มีสี เปลือกบางและใสเป็นเงา ส่วนเนื้อสีเหลืองอ่อน ไม่มีฝาปิด ออกไข่เป็นเม็ดกลม ครั้งละ 5-8 ฟอง สีขาวขนาด 0.2 มิลลิเมตร ฟักเป็นตัวภายใน 2-3 วัน

หอยดักดาน Cryptozona siamensis

เปลือกหอยมีลักษณะกลมแบน มียอดนูนสูงขึ้นเล็กน้อย ไม่มีฝาปิด สีน้ำตาลอ่อนปนขาว ค่อนข้างหนาและแข็งด้าน ออกไข่ครั้งละ 30-50 ฟองในหลุมตื้นๆตามพื้นดินที่ชื้น ไข่มีสีขาวขุ่นและนิ่ม เป็นเม็ดกลม แต่ต่อมามีลักษณะบุบเป็นเหลี่ยม

ชมพูนุทและคณะ (2537) และชมพูนุท (2538) ได้สำรวจหอยทากและทากในประเทศไทย และพบหอยทากและทากตามสวนผลไม้ต่าง ๆ ที่พบเป็นศัตรูพืชมี 10 ชนิด ได้แก่ หอยทากยักษ์อาฟริกา Giant African Snail, *Achatina fulica* (Bowdich) หอยเจดีย์ *Prosopeas walkeri* (Benson) หอยสาริกา *Sarika* spp. หอยทากซัคซิเนีย Amber Snail (*Succinea* spp.) หอยดักดาน *Cryptozona siamensis*, *Cyclotropis bedaliensis*, *Euconulus* sp. หอยหมายเลขหนึ่ง *Ovachlamys fulgens* (Gauld) หอยเชอรี่ Golden Apple Snail, *Pomacea* spp. ทาก *Parmarion pupilaris* ส่วนหอยทากอีก 2 ชนิด ได้แก่ *Quantula naninoids* ซึ่งพบกินลูกปาล์มสุกในสวนปาล์มน้ำมัน และ *Austenia doisuthepensis* ที่เคยพบในสวนลางสาด จ .ปราจีนบุรี รวมทั้งสวนกาแฟในภาคใต้นั้น ยังไม่พบเห็นการทำลายที่ชัดเจน

ชมพูนุท (2538) ได้สำรวจการระบาดของทากฟ้า (*Semperula siamensis*) ในท้องที่ตำบล อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร เป็นการรายงานการระบาดเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ในเดือนกรกฎาคม 2537 โดยกัดทำลายต้นฝักทอง พริก มะเขือ ถั่วฝักยาว แตงโม เนื่องจากทากฟ้าไม่เคยพบเป็นศัตรูพืชมาก่อน มันชอบกินซากพืชเป็นอาหาร เช่น ใบไม้ร่วงทับถมตามพื้นดิน ตอไม้ผุ ๆ ในสวนผลไม้ เป็นต้น อย่างไรก็ตามในระบบการย่อยอาหารของหอยทากและทากทั้งหลาย จะมี cellulase ซึ่งเป็นน้ำย่อยสามารถย่อยสลาย cellulose ในพืชได้ ประจวบกับพื้นที่บริเวณดังกล่าว เดิมเป็นป่าชุมชื้นมาก่อนและมีทากฟ้าอาศัยอยู่แล้วตามธรรมชาติ เมื่อถูกปรับเปลี่ยนเป็นสวนผักจึงทำให้มีแหล่งอาหารเพิ่มขึ้นนั่นเอง

หอยทากบางชนิดไม่ใช่หอยประจำถิ่นของประเทศไทยแต่เป็นหอยทากพื้นเมืองในทวีปอาฟริกา เช่น หอยทากยักษ์อาฟริกา Giant African Snail, *Achatina fulica* (Bowdich) ซึ่งในวงศ์ Afriatinidae นี้มีประมาณ 200 species อยู่ใน 13 สกุล แต่ในปัจจุบันหอยทากยักษ์อาฟริกาได้แพร่กระจายไปเกือบทุกประเทศในเขตร้อน การแพร่กระจายต่อเนื่องมานับ 50-60 ปี สำหรับในประเทศไทยมีการแพร่กระจายในทั่วเฉพาะชนิดเดียว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจชนิดของหอยทากในสวนผลไม้ส่งออก 5 ชนิด ได้แก่ ส้มโอ มะม่วง มังคุด ลำไยและลิ้นจี่ ชนิดละ 1 จังหวัดหรือเพียงภาคเดียวของประเทศไทย พบหอยทากรวมทั้งสิ้น 15 ชนิด (species) เป็นหอยทากและทากศัตรูพืช เนื่องจากกัดกินใบอ่อนและตาดอกหรือใบ จำนวน 10 ชนิด นอกนั้นยังไม่พบรายงานการเป็นศัตรูพืช อย่างไรก็ตามหอยทากและทากที่พบในสวนไม้ผลดังกล่าวไม่สามารถกัดแทะผลไม้ได้ เนื่องจากผลไม้มีเปลือกแข็งและหนา แต่อาจทำให้ผลไม้แลดูสกปรก เนื่องจากเมือกตามทางที่หอยทากเดินผ่าน อีกประการหนึ่ง ชนิดหอยทากที่พบในการสำรวจพืชผลไม่ได้ขึ้นกับชนิดของพืชผลใดๆ แต่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแหล่งนั้น เช่น ความสูงของพื้นที่จากระดับน้ำทะเล สภาพภูมิอากาศที่ชุ่มชื้นตลอดทั้งปี พื้นที่ใกล้เคียงภูเขาหินปูน และถ้าหากบริเวณที่เป็นสวนผลไม้นั้นเคยเป็นป่ามาก่อน ก็อาจมีหอยทากและทากซึ่งอยู่อาศัยดั้งเดิมมาก่อน

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2529. ชีววิทยาหอยทากรายปักษ์. ในรายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2529 กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 7 หน้า.

ชมพูนุท จรรยาเพศ, ทักษิณ อาชวาคม, ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และเกษม ทองทวี. 2537. หอยทากในประเทศไทย. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช 2537 กองกฎีและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 9 ณ โรงแรมแกรนด์จอมเทียนพาเลซ ชลบุรี 21-24 มิถุนายน 2537. หน้า 495-522.

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2538 ก. ชีวิตของทากฟ้า. ว. กีฏ. สัตว. 17(1) : 39-42.

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2538 ข. หอยทากศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยายการฝึกอบรมหลักสูตรอารักขาพืช สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ณ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 19-29 มิถุนายน 2538. 11 หน้า.

Gordon, D. 1983. Pest Slugs and Snails : Bilolgy and Control. Springer Verlag, Berlin. 445 pp.

Gordon, David G. 1994. Field guide to the Stugs. Western Society of Malacologists. Sasguatch Books, Seattle USA. 48 pp.

Kerney, M.P. and R.A.D. Cameron. 1987. A Field Guide to the Land Snail of Britain and North-West Europe. Collins, London. 288 pp.

Solem Alan. 1966. Some Non-Marine Mollusks from Thailand, with Notes on Classfication of the Helicarionidae. 110 pp. Kobenhavn 1966. 110 pp.

การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ และความรุนแรงของโรคของลำไย

Identification and Severity of Longan Disease.

พรพิมล อธิปัญญาคม

ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ พัฒน์พงศ์ ภัทรโกศล ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

.....

บทคัดย่อ

จากการสำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคชนิดต่าง ๆ ของลำไยในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ และเชียงราย และนำตัวอย่างโรคมาศึกษาในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ในปี 2544-2546 พบโรคของลำไยหลายโรค ได้แก่ โรคราน้ำฝนเกิดบนใบอ่อนและที่ผล สาเหตุเกิดจากรา *Phytophthora capsici* พบโรคระบาดที่อำเภอพร้าว 42 เปอร์เซ็นต์ และอำเภอแม่แตง จังหวัด มีการเกิดโรค 77 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราเข้าทำลายผลระยะก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 1 เดือน โดยเฉพาะช่วงที่มีฝนตกชุกติดต่อกัน นอกจากนั้นพบการระบาดของโรคใบติดสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โรคที่พบโดยทั่วไปได้แก่ โรคใบจุดสนิม โรคราดำ โรคใบติด โรคใบจุด และโรคพุ่มไม้กวาดซึ่งพบโรคระบาดกับลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว จากการศึกษาโรคลำไยครั้งนี้ยังพบโรครากเน่า สาเหตุเกิดจากรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งระบาดในอำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน พบการเกิดโรค 1-5 เปอร์เซ็นต์ และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ พบการเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์

รหัสทะเบียนวิจัย 45 11009 030

คำนำ

ลำไย (Longan) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Dimocarpus logan* Lour. (Syn. *Euphoria longana* Lam.) จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Spindaceae ลำไยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทยและเป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออกสูง ส่งออกทั้งในรูปผลสด ลำไยอบแห้ง และ ลำไยกระป๋อง สามารถกล่าวได้ว่าลำไยพืชที่ทำรายได้เข้าประเทศอยู่ในระดับต้น ๆ (Product champion) ประเทศคู่ค้าที่สำคัญได้แก่ ฮ่องกง สิงคโปร์ สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย ฝรั่งเศส และสาธารณรัฐประชาชนจีน เนื่องจากปริมาณความต้องการของตลาดยังมีอย่างต่อเนื่องจึงส่งผลให้มีการขยายพื้นที่ปลูกลำไยมากขึ้นเพื่อเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด แหล่งปลูกที่สำคัญของลำไยอยู่ทางภาคเหนือตอนบน ได้แก่ จังหวัดลำพูน เชียงใหม่ ลำปาง เชียงราย แพร่ และน่าน พันธุ์ที่นิยมปลูกมากที่สุดได้แก่ พันธุ์อีดอ รองลงมาได้แก่ พันธุ์สีชมพู และเบี้ยวเขียว

การปลูกลำไยที่ผ่านมาไม่ค่อยมีปัญหาเรื่องโรค โรคที่พบคือ โรคพุ่มไม้กวาด (witches' broom) ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากเชื้อ Phytoplasma ต้นลำไยที่เป็นโรครุนแรงจะทำให้มีอาการทรุดโทรมและตาย (ขจรศักดิ์, 2531) ปัจจุบันการปลูกลำไยเพิ่มมากขึ้นและมีปัญหาที่สำคัญๆ เพิ่มขึ้น ได้แก่ โรคหงอยของลำไย ซึ่งเป็นอาการที่ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด เมื่อลำไยเป็นโรคจะทำให้ผลผลิตลดลง (ชาตรี และคณะ , 2539) และพบโรคที่ไม่เคยพบมาก่อนคือ โรคราน้ำฝนของลำไย ซึ่งแสดงอาการใบอ่อนและยอดไหม้และผลเน่า ขจรศักดิ์ และคณะ(2540) รายงานถึงการระบาดของโรคที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ โดยพบ ใบอ่อนแสดงอาการไหม้ในเดือนตุลาคม พ .ศ. 2538 ต่อมาพบอาการผลเน่าในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2539 เนื่องจากการระบาดของโรคจะรุนแรงในช่วงฤดูฝน เกษตรกรผู้ปลูกลำไยจึงเรียกโรคนี้ว่าโรคราน้ำฝน สาเหตุ ของโรคราน้ำฝนเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* (*Phytophthora palmivora* MF 4) พบระบาดในแหล่งปลูกลำไยที่ อำเภอแม่แตง และ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ระบาดรนแรงบนลำไยพันธุ์ดอ (ขจรศักดิ์ 2541) ในปี พ.ศ. 2540 ขจรศักดิ์ และคณะ (2540) รายงานการพบโรครากเน่าของลำไยพันธุ์ดอ อายุ 3-4 ปี ในสวนเกษตรกร ตำบลชมพู อำเภอเนินมะปราง จังหวัดพิษณุโลก ซึ่งทำให้ต้นลำไยยืนต้นตาย และเป็นรายงานการพบโรครากเน่าครั้งแรกที่เป็นกับลำไย ในปัจจุบันการ ใช้สารเคมีโปแตสเซียมคลอเรตช่วยบังคับให้ต้นลำไยออกดอกติดผลนอกฤดู ก่อให้เกิดมลภาวะทางสภาพแวดล้อม ทำให้เกิดโรครากเน่าระบาดมากขึ้นที่ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ และ อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน ต้นลำไยแสดงอาการทรุดโทรมและยืนต้นตายอย่างเฉียบพลัน จากรายงานการศึกษาเบื้องต้นของขจรศักดิ์ (2540) พบโรครากเน่าลำไยระบาดรุนแรงมากขึ้นกับสวนลำไยเกษตรกรในเขต อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

โรคผลเน่าของลำไยภายหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากราเข้าทำลายภายหลังการเก็บเกี่ยวได้แก่ *Alternaria, Aspergillus, Cephalospoium, Colletotrichium, Curvularia, Fusarium,*

Mucor, Nigrospora, Penicillium, Pestalotiopsis, Paecilomyces, Rhizopus, Rhizoctonia และ Yeast (นิพนธ์, 2542) นอกจากนี้ ยังพบรา 9 สกุล บนผิวของลำไย ราดังกล่าวเป็นผลทำให้คุณภาพของผลลำไยลดลง ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการส่งออกลำไยอบแห้ง การรมผลลำไยด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวอย่างได้ผล แต่มักประสบปัญหาพิษตกค้างในเนื้อลำไย ซึ่งมีผลต่อผู้บริโภค และ Codex กำหนดให้มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในเนื้อลำไยไม่เกิน 20 ppm มีรายงานการควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของลิ้นจี่โดยชีววิธีโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis, B. megaterium, B. stearothemophilus* และ *B. subtilis* ดังนั้นการควบคุมโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของผลลำไยโดยชีววิธีน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรศึกษาวิจัย เพื่อเป็นข้อมูลแนะนำเกษตรกร ให้นำไปปฏิบัติในการป้องกันกำจัดโรคภายหลังการเก็บเกี่ยวของลำไยต่อไป การศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคต่าง ๆ ของลำ ไย ในแหล่งปลูกต่าง ๆ ตลอดจนการจัดจำแนกชนิดเชื้อราสาเหตุโรคของลำไย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ส่วนของลำใยที่เป็นโรคได้แก่ ยอดอ่อน กิ่งอ่อน ใบอ่อน ดอก ผล และราก เป็นต้น

2. สารเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อที่ผิว: สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75% benomyl nystatin PCNB rifampicin ampicillin และ hemexazol เป็นต้น

3. อาหารวุ้นสังเคราะห์ potato dextrose agar (PDA), corn meal agar (CMA), V8 juice agar และ selective media ได้แก่ RNV และ BNPRAH เป็นต้น

4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (LM) และ Stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายภาพ

5. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ เครื่องแก้ว จานเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน และกระดาษกรอง (Whatman #2) เป็นต้น

วิธีการ

1. การสำรวจรวบรวม และศึกษาลักษณะอาการของโรคลำไย

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคลำไย ในจังหวัดลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ และเชียงราย ห่อตัวอย่างโรคพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ใส่ในถุงพลาสติก และบรรจุลงในกล่องเก็บความเย็น บันทึกลักษณะอาการ และความเสียหายของพืชที่เกิดจากโรคได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค (disease incidence) โดยการสุ่มสำรวจ 10 เปอร์เซ็นต์ในแต่ละแปลง บันทึกข้อมูล ชนิดพืช สถานที่ วันที่เก็บ ผู้เก็บ เพื่อการ จัดเก็บตัวอย่างแห้งโรคพืชแห้งเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืชที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงค

ศึกษาการ พร้อมทั้ง ตรวจสอบเอกสาร สืบค้นข้อมูลโรคของลำไยเพื่อประกอบการศึกษาทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ

2. การศึกษาสาเหตุจากตัวอย่างพืชเป็นโรค

2.1 การศึกษาสาเหตุจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เขี่ยเชื้อจากตัวอย่างใบและเปลือกผลลำไยที่เป็นโรคราน้ำฝน โรคใบจุดสนิม และโรคราดำ ลงบนแผ่นสไลด์ (slide) แล้วตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.2 การศึกษาเชื้อสาเหตุของลำไยที่แสดงอาการโรคราน้ำฝน และโรครากเน่า นำส่วนของพืชที่แสดงอาการใบไหม้ ผลเน่า และรากเน่า โดยนำใบ เปลือกผล และรากลำไยมาตัดเป็นชิ้น ๆ ให้ได้ขนาด 2 x 2 มิลลิเมตร จำนวน 10 ชิ้นต่อ 1 ตัวอย่าง นำไปแช่ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri's dish) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 วัน ตรวจหาเชื้อสาเหตุที่เจริญออกมาจากชิ้นพืชในจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้หัวเลนซ์ใกล้วัตถุขนาด 10x บันทึกลักษณะของราที่ตรวจพบบนชิ้นพืช

3. การศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากส่วนของพืชที่แสดงอาการ (Tissue transplant)

ตัดส่วนของพืชที่แสดงอาการของโรค เช่น ใบไหม้ ใบติด เปลือกผลเน่า และรากเน่า ขนาด 2 X 2 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หรือ RNV หรือ BNPRAH (1 ลิตร ประกอบด้วย benomyl 10 ppm., nystatin 25 ppm., PCNB 25 ppm., rifampicin 10 ppm., ampicillin 5,000 ppm., hymexazol 25-50 ppm. โดยมี PDA เป็น basal medium) แยกเชื้อโดยวิธีดังกล่าวตัวอย่างละ 10 จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 5 ชิ้นพืช ตรวจเชื้อหลังการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน ตรวจดูเส้นใยของราที่เจริญออกมารอบชิ้นพืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยก hyphal tip ของราที่เจริญออกมา ย้ายลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของราต่อไป (ตารางที่ 2)

4. การจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุ

แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธีแยกเลี้ยงสปอร์เดี่ยว (single spore) บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และ V-8 juice agar วัดขนาดความยาวและความกว้างของ sporangium จำแนกชนิดของราโดยใช้เอกสารการจำแนกชนิดรา *Phytophthora* ของ Waterhouse (1963) และเอกสารอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา *Phytophthora*

5. การพิสูจน์เชื้อบนผลลำไย

ทำการพิสูจน์ราสาเหตุโรคราน้ำฝน บนผลลำไยพันธุ์ดอซึ่งอยู่ในระยะเก็บใกล้เก็บเกี่ยว ทำการปลูกเชื้อผลลำไยโดยทำแผลและไม่ทำแผลอย่างละ 10 ผล เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนผลลำไยที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกันอย่างละ 5 ผล แยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรคราน้ำฝน เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคราน้ำฝนที่ใช้ในการปลูกเชื้อ

6. การบันทึกข้อมูล

-บันทึกชนิดพืช สถานที่ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

-ตรวจสอบเอกสาร สืบค้นข้อมูลประกอบการศึกษาทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

- แปลงลำไยเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน และเชียงราย

ระยะเวลา 2 ปี เริ่มต้น ตุลาคม 2544

สิ้นสุด กันยายน 2546

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคของลำไย

จากการสำรวจและศึกษาโรคของลำไยในจังหวัดลำพูน ที่ อำเภอลี้ 2 แปลง อำเภอบ้านโฮ่ง 3 แปลง และอำเภอแม่ทา 3 แปลง จังหวัดลำปาง ที่อำเภอห้างฉัตร 2 แปลง จังหวัดเชียงใหม่ ที่อำเภอแม่แตง 2 แปลง อำเภอพร้าว 3 แปลง อำเภอจอมทอง 2 แปลง และ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 2 แปลง พบโรคพุ่มไม้กวาด สาเหตุจากเชื้อ Phytoplasma โรคใบจุดสนิมสาเหตุเกิดจาก *Cephaleuros virescens* โรคใบจุดสาเหตุเกิดจากราหลายชนิดด้วยกันคือ *Colletotrichum gloeosporioides, Lasiodiplodia theobromae, Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. และ *Phomopsis* sp. และราดำสาเหตุเกิดจากรา *Meliola* sp. ในทุกแหล่งที่สำรวจ ส่วนโรคราน้ำฝนสาเหตุเกิดจากจากรา *Phytophthora capsici* พบระบาดที่อำเภอพร้าว และอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ โรครากเน่าสาเหตุเกิดจากรา *Phytophthora palmivora* พบระบาดในอำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ และโรคใบติดซึ่งมีสาเหตุ เกิดจากรา

Rhizoctonia solani พบระบาดที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ (ตารางที่ 1) จากการศึกษาลักษณะอาการของโรคลำไยในแปลงปลูกและได้เก็บตัวอย่างโรคราน้ำฝน โรครากเน่าและโรคใบติดลำไยมาแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการและศึกษารายละเอียดของเชื้อสาเหตุ สำหรับโรคราดำและโรคใบจุดสนิมได้นำตัวอย่างมาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอและเขี่ยส่วนของเชื้อบนใบพืชมาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาและจำแนกชนิดของสาเหตุ แต่ไม่ได้แยกเชื้อสาเหตุเนื่องจากไม่สามารถเลี้ยงเชื้อทั้งสองนี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ส่วนโรคพุ่มไม้กวาดได้เก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะอาการและเปรียบเทียบกับอาการของโรคกับเอกสารของขจรศักดิ์ (2531) และโรคใบจุดได้นำมาแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplant พบราหลายชนิด

โรคราน้ำฝน

จากการสำรวจแปลงปลูกลำไยพบโรคราน้ำฝนของลำไยที่ อำเภอพร้าว และอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ 2545 โดยพบทั้งลักษณะอาการใบ ยอดไหม้และอาการผลเน่า จากการสำรวจที่อำเภอพร้าว 3 แปลง มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรครวม 42 เปอร์เซ็นต์ และอำเภอแม่แตง สำรวจโรค 2 แปลง พบลำไยเป็นโรค 77 เปอร์เซ็นต์ ผลการสำรวจพบว่าโรคราน้ำฝนสามารถเกิดได้บนลำไยพันธุ์ดอทุกอายุ การเกิดโรคขึ้นกับปริมาณและความชุกของฝนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงลำไยติดผลใกล้เก็บเกี่ยว และในช่วงลำไยแตกใบอ่อนหลังจากการเก็บเกี่ยวหรือหลังจากการตัดแต่งกิ่งจะพบการระบาดของโรคราน้ำฝนมาก

1. ลักษณะอาการของโรค

1.1 ลักษณะอาการของโรคบนใบ

พบอาการใบไหม้เกิดบนใบอ่อน ใบเพสลาด และกิ่งอ่อนเท่านั้น ลักษณะการทำลายทำให้เกิดอาการเน่าลุกลามที่ใบอ่อน ยอดและกิ่งอ่อน ใบที่ถูกทำลายจะร่วง ส่วนใบอ่อนและกิ่งอ่อนเมื่อเป็นโรคจะแห้งมีสีน้ำตาลคล้ำทั่วทั้งต้น การระบาดของโรคเกิดในช่วงเวลาที่ลำไยแตกกิ่งใบออกมาใหม่หลังจากตัดแต่งกิ่ง ซึ่งโดยทั่วไปการทำสวนลำไยจะมีการตัดแต่งกิ่งภายหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ในช่วงเดือนกันยายนหลังจากตัดแต่งกิ่งต้นลำไยจะมีใบอ่อนและยอดอ่อนทั่วทั้งทรงพุ่ม โรคใบไหม้และยอดไหม้จึงระบาดไปทั่วทั้งต้นและระบาดทั่วทั้งสวน ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่ยังมีฝนตกชุก ความชื้นสูง ใบและกิ่งอ่อนลำไยที่เป็นโรคจะมีเชื้อราฟูขาว เมื่ออากาศแห้งเชื้อราฟูขาวก็จะหายไป โดยเหตุที่การระบาดของโรคเป็นไปอย่างรุนแรงเมื่อมีฝนตกติดต่อกันเกษตรกรจึงเรียกโรคนี้ว่า " โรคราน้ำฝน" เนื่องจากยอดอ่อนของลำไยถูกทำลายหมด หลังการถูกทำลายต้นลำไยจะแตกกิ่งและใบใหม่ หากยังมีฝนตกอยู่เรื่อย ๆ ใบและกิ่งอ่อนที่ผลิออกมาใหม่ก็จะถูกทำลายอีก จนกระทั่งถึงปลายเดือนพฤศจิกายน เมื่อหมดฝนแล้วช่วงนี้ลำไยที่ถูกโรครบกวนจะผลิกิ่งและ

ใบใหม่อีกครั้งและพบว่าการทำลายของโรคจะน้อยลงจนถึงไม่พบเลย แต่อาจมีผลต่อความพร้อมของยอดที่จะให้ดอกออกผลในฤดูต่อไป

1.2 ลักษณะอาการของโรคบนผล ผลลำไยก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 1 เดือน ซึ่งผลลำไยเริ่มมีความหวานมีลักษณะอาการผลเน่าและร่วง การระบาดของโรคพบในช่วงที่มีฝนตกชุกติดต่อกันโดยตลอด ผลลำไยที่เป็นโรคในขณะที่มีความชุ่มชื้นสูงจะเห็นปุยขาว ๆ ของรา ซึ่งเกษตรกรเรียกว่า "โรคราน้ำฝน" เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นที่ใบและยอดอ่อน ผลลำไยที่ยังแก่ไม่เต็มที่เมื่อเป็นโรคนี้จะมีอาการผลแตกเห็นเนื้อในผล ส่วนผลลำไยที่โตเต็มที่แล้วเมื่อเป็นโรคผลลำไยจะเน่าและร่วง ผลลำไยที่เป็นโรคแต่อาการไม่รุนแรงจะมีรอยแผลสีน้ำตาลที่ผลไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และเมื่อนำไปทำลำไยอบแห้งผลจะแตกในระหว่างการอบ

2. การศึกษาสาเหตุของโรค

2.1 การตรวจเชื้อจากตัวอย่างพืชเป็นโรค

2.1.1 ผลจากการตรวจเชื้อสาเหตุโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างโรคใบไหม้และผลเน่า เชื้อราที่ขึ้นฟูขาวบนใบ กิ่งอ่อน และผลเน่าตรวจพบ sporangium ของเชื้อราเป็นจำนวนมาก

2.1.2 จากการตรวจเนื้อเยื่อพืชเป็นโรคโดยแช่น้ำเป็นเวลา 1-2 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบเส้นใยของเชื้อราและ sporangium ที่ยังอ่อนและแก่ งอกออกมาจากชิ้นส่วนพืชทุกชิ้น และ sporangium ที่ได้มีรูปร่างและลักษณะคล้ายคลึงกับที่ตรวจโดยวิธีการเขี่ยเชื้อจากตัวอย่างพืชเป็นโรค

2.2 การศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค บนอาหาร RNV หรือ BNPRAH จากตัวอย่างใบอ่อน ใบเพสลาด และกิ่งอ่อน ที่เป็นโรคใบไหม้ และผลเน่า ทุกตัวอย่างแยกได้เชื้อรา ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่ตรวจพบจากวิธีการเขี่ยเชื้อจากตัวอย่างพืชเป็นโรคโดยตรง เชื้อราที่แยกได้จากโรคใบไหม้และผลเน่า ทำให้บริสุทธิ์และแยกเลี้ยงบนอาหาร PDA และ V-8 juice agar เนื่องจากการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA เจริญได้ค่อนข้างช้า แต่เจริญได้ดีกว่าบนอาหาร V-8 juice agar จึงใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง

2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อรา

จำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกจากใบที่เป็นโรคใบไหม้ พบว่าโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ V-8 juice agar มีสีขาวลักษณะฟูเล็กน้อย เส้นใยของเชื้อราไม่มีผนังกั้นและไม่มีสี sporangium งอกเป็นเส้นใยได้โดยตรง เมื่ออยู่ในน้ำ sporangium จะปล่อย zoospores ออกมาทางปากเปิด (papilla) ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อราชนิดนี้ sporangium มีขนาด ความยาว x กว้าง 22.5-

65.0 x 15.0-30.0 μm ขนาดเฉลี่ย 43.2 x 21.4 μm ก้านชู sporangium ยาวมากกว่า 250 μm L : B ratio = 2 : 1 จำแนกชนิดเป็น *Phytophthora capsici*

จำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกจากผลเน่า เชื้อรา *Phytophthora* ดังกล่าวที่แยกได้จากโรคผลเน่ามีขนาดของ sporangium ความยาว x กว้าง มีขนาด 23.0-70.4 x 15.5-30.2 μm ขนาดเฉลี่ย 43.8-21.9 x 21.9 μm ก้านชู sporangium ยาวมากกว่า 250 μm L : B ratio = 2 : 1 จำแนกชนิดได้เป็น *P. capsici*

เชื้อสาเหตุจะสร้าง sporangium ซึ่งจะผลิต zoospore แพร่ไปกับน้ำฝน เข้าทำลายผลลำไยในช่วงติดผลและทำลายใบอ่อนในช่วงผลิใบอ่อนหลังการเก็บเกี่ยวผลลำไยแล้ว ซึ่งเป็นระยะที่มีฝนตกชุกติดต่อกัน โดยปกติเชื้อราอาศัยอยู่ในดินเมื่อ มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมจึงเข้าทำลาย

โรคพุ่มแจ้หรือโรคพุ่มไม้กวาด

จากการสำรวจพบอาการของโรคพุ่มไม้กวาดในแทบทุกแหล่งปลูกบนลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ตารางที่ 2)

ลักษณะอาการของโรค

ยอดอ่อนถูกทำลายมักตรวจพบไรสี่ขาดูดกินน้ำเลี้ยง ไรเหล่านี้เมื่อดูดทำลายบนส่วนต่างๆ ของพืช มักจะปล่อยสารพิษเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติในรูปแบบต่างๆ ตาลำไยเพียงตาเดียวจะแตกเป็นยอดอ่อนได้มากกว่า 20 ยอด แต่ละยอดยาวสั้นต่างๆ กัน ส่วนใหญ่ยาวไม่ถึงเซ็นติเมตรและรวมกันเป็นกระจุก พบระบาดกับลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว (ตารางที่ 2) การแพร่ระบาดของโรคจะติดไปกับกิ่งพันธุ์ปลูก โดยการตอนหรือขยายพันธุ์จากต้นเป็นโรคเช่น ปักชำหรือเสียบยอด

สาเหตุเกิดจาก Phytoplasma

โรคใบจุดสนิม (Red rust, Agal spot)

เป็นโรคที่พบบนใบแก่ของลำไยในทุกแหล่งที่สำรวจ ในพื้นที่มีสภาพอากาศค่อนข้างชื้นจะพบการเกิดโรคสูงกว่าในสภาพอากาศแห้ง เช่นที่อำเภอลี้ จังหวัดลำพูนพบโรค 20 เปอร์เซ็นต์ อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่เป็นโรค 24 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นหุบเขาค่อนข้างชื้น นอกจากนี้ในแปลงที่ไม่มีการดูแลจะพบโรคจุดสนิมเช่นกัน เช่น แปลงที่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย พบโรคสูงถึง 24 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2)

ลักษณะอาการ

ใบของลำไยเกิดจุดแผลกลมสีปนเทากระจายบนผิวด้านบนใบ ด้านล่างของใบไม่พบอาการ จุดแผลที่เป็นโรคเมื่อมีอายุมากขึ้นมีลักษณะฟูเป็นขุยสีสนิมเหล็ก มองดูคล้ายกำมะหยี่ ด้านล่างของใบเป็นแผลเนื่องจากเนื้อเยื่อถูกทำลาย ถ้าอาการของโรครุนแรงทำให้ใบที่เป็นโรคแห้งและร่วง เชื้อสาเหตุแพร่กระจายโดยลมและฝน พบโรคในทุกฤดู แต่พบ โรคระบาดรุนแรงในช่วงที่มีความชื้นสูงอากาศค่อนข้างเย็น พบระบาดทั่วไปในสวนลำไยที่มีทรงพุ่มหนาทึบ โดยเฉพาะสวนที่ไม่ได้รับการดูแลเท่าที่ควร โรคจุดสนิมพบระบาดโดยทั่วไปในแปลงปลูกลำไย แต่ไม่ทำความเสียหายมากนัก เนื่องจาก โรคจุดสนิมไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นลำไยแต่มีผลต่อการสังเคราะห์แสงโดยจะลดการสังเคราะห์แสงของใบ ส่วนใหญ่เกิดอาการบนใบแก่ที่ได้รับแสงแดด เนื่องจากสาหร่ายซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพืชจึงต้องการแสงแดดและความชื้นในการเจริญเติบโต พบการระบาดทุกพื้นที่ที่สำรวจ (ตารางที่ 2)

สาเหตุเกิดจาก *Cephaleuros virescens* Kunze.

โรคราดำ

จากการสำรวจพบโรคราดำในทุกแหล่งปลูกเช่นเดียวกับโรคใบจุดสาหร่าย บริเวณที่พบโรคราดำมากคือที่อำเภอลี้ จังหวัดลำพูน อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่พบโรค 18 และ 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแหล่งที่มีความชื้นสูงกว่าในแหล่งปลูกอื่น ส่วนที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงรายพบโรค 22 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเป็นแปลงที่ไม่มีการดูแลตัดแต่งกิ่งจึงทำให้เกิดการสะสมของโรค (ตารางที่ 2)

ลักษณะอาการ

เชื้อสาเหตุขึ้นคลุมบนผิวของใบลำไย ลักษณะเป็นเส้นใยสีดำเกิดกระจัดกระจายบนผิวด้านใต้ใบและเจริญเชื่อมกันเป็นแผ่นใหญ่ เชื้อสาเหตุไม่ทำลายพืชโดยตรงแต่จะทำให้การสังเคราะห์แสงของใบลดลง คราบสีดำจะพบได้ทั้งบนใบ กิ่ง ช่อดอก และผล ถ้าพบอาการบนช่อดอกทำให้ไม่มีการผสมเกสร ช่อดอกจะแห้งและหลุดร่วงไป เมื่อเกิดอาการบนผลทำให้ผลมีสีดำทำให้เสียราคาเมื่อจำหน่าย โดยทั่วไปเส้นใยของเชื้อราสาเหตุเจริญอยู่บนผิวไม่ลุกลามเข้าไปในเซลล์พืช สามารถหลุดออกได้ง่ายเมื่อใช้มือถูโดยเฉพาะราดำที่พบบนใบจะหลุดร่อนได้ง่ายกว่าที่พบบนกิ่ง การแพร่ระบาดของราดำเนื่องมาจากแมลงปากดูดที่ทำลายยอดอ่อนของลำไยและถ่ายน้ำหวานออกมาเคลือบบนส่วนต่าง ๆ ของพืช เชื้อราจะอาศัยน้ำหวานเหล่านี้เป็นอาหาร และสามารถแพร่กระจายต่อไปโดยลมและน้ำฝน พบการระบาดทุกพื้นที่ที่สำรวจ (ตารางที่ 2)

สาเหตุเกิดจาก

Meliola sp.

โคโลนีขึ้นเป็นจุดสีดำบนใบ ขนาดประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ขึ้นฟูบนผิวด้านใต้ใบ เส้นใยมีสีน้ำตาลเข้ม ขนาดของเซลล์ 7x21 ไมครอน มีผนังกั้น สร้าง Mycelial setae สีน้ำตาลเข้ม ขนาดยาวประมาณ 50 ไมครอน ลักษณะตรง ด้านปลายแตกเป็นชั้นหรือแฉก พบโดยทั่วไปและเจริญอยู่รอบ ๆ perithecium

Perithecium สีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างกลลม ผิวขรุขระ (ภาพที่ 4B) พบกระจายอยู่ทั่วไปบนโคโลนี ชูขึ้นมาบนใบพืช สร้าง ascus ภายใน perithecium มี 8 ascospores และ ascospores สีน้ำตาลเข้ม รูปร่างกลมเรียว (oblong) ปลายกลมมน มีผนังกั้นแบ่งเป็น 5 เซลล์ และมีรอยคอดที่ผนังเล็กน้อย

Meliola sp. จัดอยู่ใน Order Meliolales Class Ascomycetes

โรคใบจุดดำ

จากการสำรวจพบโรคใบจุดทุกพื้นที่ โดยเฉพาะในพื้นที่มีสภาพความชื้นสูงพบโรคมากกว่าในพื้นที่ที่มีสภาพอากาศแล้ง และพบโรคสูงในแปลงที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย เช่นเดียวกับโรคอื่นเนื่องไม่มีการดูแลแปลง (ตารางที่ 2)

ลักษณะอาการ

เชื้อสาเหตุเข้าทำลายใบของลำไยทำให้เกิดจุดแผลสีน้ำตาลอ่อนลักษณะกลม ต่อมาแผลเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ เมื่อมีความชื้นสูงอาจพบเส้นใยสีขาวของราขึ้นบนแผล สปอร์ของเชื้อสาเหตุแพร่กระจายไปตามลม และละอองน้ำฝน พบระบาดในสวนลำไยทั่วไป โดยเฉพาะช่วงที่มีสภาพอากาศชื้น หากระบาดรุนแรงทำให้สูญเสียพื้นที่ใบในการสังเคราะห์แสง พบการระบาดทุกพื้นที่ที่สำรวจ (ตารางที่ 2) พบเชื้อหลายชนิดได้แก่

สาเหตุเกิดจาก *Colletotrichum gloeosporioides*

Pestalotiopsis sp.

Phomopsis sp.

Lasiodiplodia theobremae

Curvularia sp.

Nigrospora sp.

โรคใบติด

จากการสำรวจพบโรคใบติดของลำไยที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งสภาพแปลงปลูกเป็นหุบเขามีความชื้นสูงพบโรค 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบโรคใบติดในแปลงปลูกอื่น (ตารางที่ 2)

ลักษณะอาการ

ราเข้าทำลายใบ สร้างเส้นใยเจริญอยู่บนใบ พบราระบาดมากในช่วง ฤดูฝน ราเจริญลุกลามไปยังส่วนอื่น เช่น กิ่ง ก้าน สร้างเส้นใยสีขาวแผ่กระจายไปตามจากขั้วใบสู่ผิวใบ และกิ่ง โดยเส้นใยเจริญด้านใต้ใบคล้ายใยแมงมุม เส้นใยเหล่านี้อาจจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ายเส้นด้าย และขยายตัวอย่างรวดเร็วเป็นแผลสีน้ำตาลและแห้ง ใบที่แสดงอาการเมื่อแห้งจะหลุดร่วงจากต้น แต่ใบเหล่านี้จะถูกดึงไว้ด้วยเส้นใยของราที่อยู่ระหว่างใบและกิ่ง ทำให้มองเห็นใบแห้งห้อยอยู่บนต้นไม่ร่วงลงดิน เส้นใยของราที่เจริญบนใบและกิ่งเหล่านี้สามารถจะลอกออกจากผิวพืชได้โดยง่าย

สาเหตุเกิดจาก

Rhizoctonia solani

โคโลนีบนอาหาร V-8 juice agar อายุ 5 วัน เส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ในห้องปฏิบัติการ โคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลแก่ สังเกตได้จากความหนาแน่นของเส้นใยที่มีความหนาแน่นมากและเจริญเกือบเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีจำนวนนิวเคลียสหลายนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์ (mulitinucleate) และในเวลาเพียง 2 วัน สร้างเม็ด sclerotium โดยในระยะนี้จะสังเกตเห็นว่าเส้นใยเจริญแบนราบไปกับผิวอาหารเป็นส่วนใหญ่ สีของเส้นใยเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลในที่สุด เช่นเดียวกับเม็ด sclerotium นอกจากมีรูปร่างทรงกลมแล้ว บนผิวของเม็ด sclerotium จะพบว่ามีรูและมีหยดน้ำเกาะอยู่ทั่วไป การกระจายของเม็ด sclerotium ที่เกิดบนอาหารพบว่าเกิดกระจายทั่วทั้งผิวอาหารแต่จะเกิดหนาแน่นบริเวณขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนใหญ่

โรครากเน่า

จากการสำรวจพบโรครากเน่าที่อำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน 1-5 เปอร์เซ็นต์ และที่ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) พบในแปลงที่พบโรคมีการใช้สารเร่งดอกในอัตราสูง ทำให้รากเสียหายเป็นช่องทางที่ราสาเหตุเข้าทำลาย ทำความเสียหายให้ต้นลำไยยืนต้นตายในที่สุด

ลักษณะอาการ

เชื้อสาเหตุเข้าทำลายที่รอยต่อระหว่างรากและลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ระดับผิวดินดิน ทำลายราก เกิดอาการเน่ามีสีน้ำตาล ในขณะที่ปลายรากฝอยยังปกติ ใบลำไยสลดเหลือง อาการเน่าจะลุกลามไปส่วนของรากแขนงในที่สุดทำให้ใบลำไยเหี่ยวแห้งทั้งต้น ถ้าอากาศร้อนแดดจัดใบจะแห้งติดต้นและยืนต้นตาย เชื้อสาเหตุจะสร้าง sporangium ซึ่งจะผลิต zoospore แพร่ไปกับน้ำ และเป็นเชื้อราที่อาศัยในดิน ระบาดในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกชุก จากการสำรวจโรคของลำไยที่ผ่านมาไม่พบโรครากเน่าของลำไยที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* แต่ในปัจจุบันเริ่มพบอาการโรครากเน่าของลำไยในหลายพื้นที่ เนื่องจากการทำลำไยนอกฤดู ทำให้รากลำไยอ่อนแอง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุซึ่งเป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ในดิน พบการเกิดโรคที่อำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 1-5 เปอร์เซ็นต์ และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 10 เปอร์เซ็นต์

สาเหตุเกิดจาก

Phytophthora palmivora

ราสร้างโคโลนีสีขาวฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar เส้นใยสีขาวไม่มีผนังกั้น sporangium แบบ papillate ขนาด 30.5-75.0 x 20.0-27.5 μm, ขนาดเฉลี่ย 52.5 x 23.9 μm, L:B ratio = 2.1:1 จำแนกชนิดของเชื้อราได้เป็นชนิด *Phytophthora palmivora* Butler.

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคชนิดต่าง ๆ ของลำไยในเขตภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ และเชียงราย ในปี 2544-2546 พบโรคพุ่มไม้กวาด สาเหตุจากเชื้อ Phytoplasma โรคใบจุดสาห่าย มีสาเหตุจาก *Cephaleuros virescens* โรคใบจุดสาเหตุจากเชื้อราหลายชนิดด้วยกันคือ *Colletotrichum gloeosporioides, Lasiodiplodia theobromae, Pestalotiopsis* sp., *Curvularia* sp., *Nigrospora* sp. และ *Phomopsis* sp. และราดำมีสาเหตุจากเชื้อรา *Meliola* sp. ในทุกแหล่งที่สำรวจ ส่วนโรคราน้ำฝน โรคใบไหม้ มีเชื้อสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* พบระบาดที่อำเภอพร้าว และอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ โรครากเน่า เชื้อสาเหตุจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* พบระบาดในอำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน และอำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ และโรคใบติดซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบระบาดที่อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

ขจรศักดิ์ ภวกุล. 2541. ราไฟโรคร้ายของลำไย. กสิกร ปีที่ 71 ฉบับที่ 4 กรกฎาคม-สิงหาคม 2541. หน้า 327-330.

ขจรศักดิ์ ภวกุล และศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2544. โรคของลำไย ส้มเขียวหวาน ส้มโอ และมะนาว. เอกสารประกอบการฝึกอบรม ความรู้พื้นฐานด้านโรคพืช . จัดโดยสมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ กรมวิชาการเกษตร และกรมส่งเสริมการเกษตร ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วันที่ 15-16 มีนาคม 2544. หน้า 1-14.

ขจรศักดิ์ ภวกุล ชัยวัฒน์ กระตุฤกษ์ และมาโนช ทศพล . 2536. การตัดแต่งกิ่งควบคู่กับการใช้สารปฏิชีวนะในการบำบัดรักษาโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย. รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2536 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 69-78.

ขจรศักดิ์ ภวกุล ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ สุชาติ วิจิตรานนท์ ชัยวัฒน์ กระตุฤกษ์ สุรชาติ คูอาริยะกุล มาโนช ทศพล และสมศักดิ์ ชัยศิลปิน . 2531. การศึกษาปฏิกิริยาของลำไยพันธุ์ต่าง ๆ ต่อโรคพุ่มไม้กวาด. รายงานผลงานวิจัย พ .ศ. 2531 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 53-61.

ขจรศักดิ์ ภวกุล สุชาติ วิจิตรานนท์ และชัยวัฒน์ กระตุฤกษ์ . 2535. ศึกษาการแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคพุ่มไม้กวาดในแหล่งปลูกลำไย. รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2535. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.หน้า14-25.

ขจรศักดิ์ ภวกุล พัชรินทร์ เทียมสกุล และสิริ สุวรรณเขตนิยม . 2542. การศึกษาโรคใบไหม้ของลำไย: ลักษณะอาการ สาเหตุโรคและการป้องกันกำจัดด้วยสารเคมี รายงานสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพืชด้วยสารเคมี วันที่ 14-15 กันยายน 2541 โรงแรมเชียงใหม่ภูคำ จังหวัดเชียงใหม่ สวพ. เขต 1 กรมวิชาการเกษตร หน้า 63-73.

ขจรศักดิ์ ภวกุล พัชรินทร์ เทียมสกุล และมาโนช ทศพล. 2540. โรครากเน่าของลำไย. วารสารโรคพืช ปีที่ 12: 123-128.

ชาตรี สิทธิกุล จริยา วิสิทธิ์พานิช และวิชชา สอาดสุด . 2539. การแพร่กระจายและความเสียหายของลำไยที่เป็นโรคหงอยในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน. วารสารเกษตร 12(2): 104-114.

นิพนธ์ วิสารทานนท์. 2542. โรคไม้ผลเขตกึ่งร้อน เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการหลักสูตร “ หมอพืช-ไม้ผล” ฉบับที่ 2 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 144 หน้า.

บัญชา ชิณศรี. 2542. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับโรคหงอยในลำไย. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. ฉบับที่ 3. ปีที่ 9. หน้า 10-13.

พิพัฒน์ เซี่ยงหลิว. 2532. ราดำในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 177หน้า.

ตารางที่ 1 โรคลำไยและเชื้อสาเหตุที่พบการระบาดในจังหวัดต่าง ๆ

โรคของลำไย	เชื้อสาเหตุ	ส่วนที่เป็นโรค	สถานที่
โรคราน้ำฝนและโรคใบไหม้	*Phytophthora capsici*	ยอดอ่อน กิ่งอ่อน ผลใบอ่อน	อ. แม่แตง อ. พร้าว จ.เชียงใหม่
โรคพุ่มไม้กวาด (โรคพุ่มแจ้ โรคกะหรี่)	Phytoplasma	ยอดอ่อน	-อ.ลี้ อ.บ้านโฮ่ง จ.ลำพูน -อ.ห้างฉัตร จ. ลำปาง -อ.แม่แตง อ. พร้าว อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่ -อ. เมือง จ.เชียงราย
โรคใบจุดสาหร่าย	*Cephaleuros virescens*	ใบ ผล	-อ.บ้านโฮ่ง อ.ลี้ จ.ลำพูน -อ.ห้างฉัตร จ. ลำปาง -อ.แม่แตง อ. พร้าว อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่ -อ. เมือง จ.เชียงราย
โรคราดำ	*Meliola* sp.	ใบ ผล	-อ.บ้านโฮ่ง อ.ลี้ จ.ลำพูน -อ.ห้างฉัตร จ. ลำปาง -อ.แม่แตง อ. พร้าว อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่ -อ. เมือง จ.เชียงราย
โรคใบจุด	*Colletotrichum gloeosporioides* *Lasiodiplodia theobromae* *Pestalotiopsis* *Curvularia* *Nigrospora* *Phomopsis*	ใบ	-อ.บ้านโฮ่ง อ.ลี้ จ.ลำพูน -อ.ห้างฉัตร จ. ลำปาง -อ.แม่แตง อ. พร้าว อ. จอมทอง จ. เชียงใหม่ -อ. เมือง จ.เชียงราย
โรคใบติด	*Rhizoctonia solani*	ใบ	อ.แม่แตง จ. เชียงใหม่
โรครากเน่า	*Phytophthora palmivora*	ราก, โคนต้น	-อ. แม่ทา จ. ลำพูน -อ. จอมทอง จ.เชียงใหม่

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่าง ๆ ของลำไย จากการสำรวจในปี 2544-2545

โรค	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค							
	ลำปาง	จ.ลำพูน			จ.เชียงใหม่			จ.เชียงราย
	อ.ห้างฉัตร	อ.ลี้	อ.บ้านโฮ่ง	อ.แม่ทา	อ. แม่แตง	อ.พร้าว	อ.จอมทอง	อ.เมือง
โรคราน้ำฝน โรคใบไหม้	0	0	0	0	77	42	0	0
โรคพุ่มไม้กวาด	8*	15*	5*	5*	7*	0	0	10*
โรคใบจุดสาหร่าย	6	20	12	15	24	13	8	30
โรคราดำ	10	18	17	15	20	15	10	22
โรคใบจุด	15	10	10	8	15	24	15	20
โรคใบติด	0	0	0	0	10	0	0	0
โรครากเน่า	0	0	0	1-5	0	0	10	0

* = พบบนลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียว

ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก

Efficacy of Insecticides for Controlling Diamondback Moth,

Plutella xylostella (Linnaeus)

สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น สัจจะ ประสงค์ทรัพย์

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงที่แนะนำบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลีที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงทดลองที่ 1 ระหว่างเดือน มกราคม – มีนาคม 2545 และแปลงทดลองที่ 2 ระหว่างเดือน มิถุนายน -สิงหาคม 2546 วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธีคือ พ่นสารฆ่าแมลง abamectin, chlorfenapyr, fipronil, spinosad, abamectin สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, chlorfenapyr สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari และ indoxacarb อัตรา 60 มล., 40 มล., 60 มล., 20 มล., 60 มล.: 80 กรัม, 40 มล.: 80 กรัม, 60 มล. : 80 กรัม, 20 มล. : 80 กรัม และ 15 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับและกรรมวิธีไม่พ่นสาร พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผัก 0.0 – 17.0 ตัวต่อ 10 ต้น และได้ผลผลิต 5.4 – 9.2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 36.3 – 154.0 ตัวต่อ 10 ต้น และไม่ได้ผลผลิต

ทะเบียนวิจัยที่ 4506006023

คำนำ

พืชผักตระกูลกะหล่ำ (*Crucifers, Brassica* spp) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกประมาณ 343,000 ไร่ เนื่องจากเป็นพืชผักที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวันจึงมีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดรอบ ๆ กรุงเทพฯ พืชผักตระกูลนี้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาวขาวปลี คะน้ำ ผักกาดหัว กวางตุ้ง และบร๊อคโคลี่ เป็นต้น (ปิยรัตน์ และคณะ,2542) ปัญหาการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำที่สำคัญ คือ แมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ และด้วงหมัดผัก เป็นต้น

หนอนใยผัก (Diamondback moth : *Plutella xylostella* (Linnaeus)) เป็นหนอนผีเสื้อที่สำคัญที่สุด ก่อให้เกิดความเสียหาย ตามแหล่งปลูกผักเพื่อเป็นการค้าจะพบการระบาดเสมอ ๆ และรวดเร็ว ปิยรัตน์และคณะ (2531) ได้รายงานว่าวงจรชีวิตของหนอนใยผัก 17 – 18 วัน ในเดือนเมษายน – พฤษภาคม และ 29 วัน ในเดือนพฤศจิกายน – ธันวาคม หรือมี 17 – 25 ชั่วอายุขัยต่อปี จึงมักพบหนอนใยผักระบาดรวมเร็วและรุนแรงเสมอในเขตเกษตรที่ราบทั่ว ๆ ไป อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่า หนอนใยผักเป็นแมลงที่มีการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้เร็วและมากมายหลายชนิด (วินัย, 2535 และ Rushtapakornchai *et al.,* 1995) โดยเฉพาะแหล่งปลูกผักแบบการค้าที่มีการปลูกผักต่อเนื่องตลอดปี ซึ่งมีการใช้สารฆ่าแมลงมากและบ่อยครั้ง วินัยและอนันต์ (2532) พบว่า หนอนใยผักจากแหล่งปลูกบางแค กรุงเทพฯ ปทุมธานี อำเภอท่าม่วง อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่และอำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ มีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง กลุ่มยับยั้งการเจริญเติบโตคือ teflubennzuron, กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ คือ fenvalerate และ cyhalothrin L และกลุ่มออร์แกนโนฟอสเฟต คือ phenthoate, mevinphos และ prothiofos ดังนั้น การศึกษาประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงที่แนะนำบางชนิด สลับกับการใช้เชื้อแบคทีเรีย ก็จะเป็นแนวทางการเลือกใช้สารได้อย่างถูกต้องมีประสิทธิภาพและที่สำคัญ เชื้อแบคทีเรียไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต ซึ่งจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถชลอหรือลดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงรวมทั้งลดปัญหาสารพิษตกค้างจากการใช้สารฆ่าแมลงลงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี (Speed 047)
2. สารฆ่าแมลง abamactin (Jacket 1.8%EC), chlofenapyr (Rampage 10%SC) , fipronil (Ascend 5%SC) , indoxacarb (Ammate 15%SC), spinosad(Success 12%SC),
3. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var aizawai (Centari WDG)
4. สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb (Pencozeb 80 % WP)

5. เครื่องพ่นสารแบบโยกสะพายหลัง
6. ปุ๋ยเคมีสูตร 20-20-0,15-15-15
7. ปุ๋ยทางใบ (Sorba-spray CaB)

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่น abamectin (Jacket 1.8%EC) อัตรา 60 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 พ่น chlofenapyr (Rampage 10%SC) อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 พ่น fipronil (Ascend 5%SC) อัตรา 60 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 พ่น spinosad (Success 12%SC) อัตรา 20 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 พ่น abamectin 1 ครั้ง อัตรา 60 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
สลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย (Centari WDG) 1 ครั้ง อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 พ่น chlorfenapyr 1 ครั้ง อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
สลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย (Centari WDG) 1 ครั้ง อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 พ่น fipronil 1 ครั้ง อัตรา 60 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
สลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย (Centari WDG) 1 ครั้ง อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8 พ่น spinosad 1 ครั้ง อัตรา 60 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
สลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย (Centari WDG) 1 ครั้ง อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 9 พ่น indoxacarb (Ammate 15%SC) อัตรา 15 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 10 ไม่ใช้สารฆ่าแมลง

ดำเนินการทดสอบที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงทดลองที่ 1 ระหว่างเดือนมกราคม - มีนาคม 2545 แปลงทดลองที่ 2 ระหว่างเดือน มิถุนายน -สิงหาคม 2546 โดยทำการย้ายกล้ากะหล่ำปลีอายุ 25 วัน ลงในแปลงทดลอง ซึ่งมีขนาดแปลงย่อย 1.4 x 15 เมตร ระยะปลูกระหว่างแถว 40 เซนติเมตร ระหว่างต้น 30 เซนติเมตร เริ่มพ่นสารทดลองตามกรรมวิธีครั้งแรก เมื่อพบหนอนใยผัก เฉลี่ย 1 ตัวต่อต้น โดยพ่นสารทดลองทุก 5 วัน จำนวน 7 ครั้ง ตรวจนับปริมาณหนอนใยผักทุกครั้งก่อนพ่นสารทดลองโดยวิธีสุ่มตรวจนับจากกะหล่ำปลี จำนวน 10 ต้นต่อแปลงย่อย และทำการเปรียบเทียบน้ำหนักและคุณภาพผลผลิตระยะส่งตลาดของกะหล่ำปลี จากการสุ่มกะหล่ำปลีในพื้นที่ 1.0 ตารางเมตร เมื่อกะหล่ำปลีอายุได้ 65 วัน หลังย้ายกล้าและนำข้อมูลที่ทำการบันทึกไว้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

แปลงทดลองที่ 1

จากการตรวจนับจำนวนหนอนใยผัก รวม 8 ครั้ง (ก่อนพ่นสารทดลอง 1 ครั้งและหลังพ่นสารทดลอง 7 ครั้ง) ตาม ตารางที่ 1 พบว่าก่อนพ่นสารทดลองพบหนอนใยผักในทุกกรรมวิธี ระหว่าง 14.0 – 21.0 ตัวต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 7 ครั้ง พบหนอนใยผักมีความแตกต่างทางสถิติทุกครั้ง คือ หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 1 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 3.0 – 11.7 ตัวต่อ 10 ต้นน้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ที่พบหนอนใยผัก 36.3 ตัวต่อ 10 ต้น

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 2 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 1.3 – 9.3 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 57.0 ตัวต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร spinosad พบจำนวนหนอนใยผัก 1.3 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร abamectin ที่พบหนอนใยผัก 9.3 ตัวต่อ 10 ต้น

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 2.0 – 17.0 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 85.0 ตัวต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร chlorfenapyr, fipronil และ indoxacarb พบจำนวนหนอนใยผัก 2.0, 3.3 และ 2.3 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร abamectin, abamectin สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari และ spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari ที่พบหนอนใยผัก 17.0, 11.0 และ 11.3 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 4,5,6 และ 7 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 1.3–12.7, 0.3 – 5.7 , 0.3-3.3 และ 0.0 - 7.3 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 121.7, 154.0, 95.0 และ 58.7 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ

สำหรับผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดที่มีคุณภาพตาม ตารางที่ 2 พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารมีน้ำหนักผลผลิตระหว่าง 5.4 – 9.2 กิโลกรัม/ ตารางเมตร มากกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ที่ไม่ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ โดยกรรมวิธีพ่นสาร chlorfenaypr, fipronil, spinosad, chlorfenaypr สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari และ indoxacarb ให้ผลผลิต 9.2, 8.9, 8.4, 8.9, 8.6, 8.3 และ 9.0 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับมากกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร abamectin และ abamectin สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari ที่ได้ผลผลิต 5.4 และ 7.2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ และกรรมวิธีพ่นสาร chlorfenaypr ก็ให้ผลผลิตมากกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร spinosad และ spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari

แปลงทดลองที่ 2

จากการทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงที่แนะนำในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก พบว่าสารฆ่าแมลง abamectin, chlorfenapyr,fipronil,spinosad และ indoxacarb ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหม่แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก เช่นเดียวกับ Zhang et.al (2001) ได้รายงานว่า อัตราการตายของหนอนใยผักวัย 3 เมื่อได้รับสาร avermectin,fipronil,chlorfenapyr และ spinosad เท่ากับ 81.7,100,100 และ 100 % หลังพ่นสาร 2 วัน และแสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก ในพื้นที่ที่มีการต้านทานต่อสารฆ่าแมลง ขณะ ที่ วินัยและณัฐวัฒน์ (2538) ได้รายงานว่า abamectin, fipronil และchlorfenapyr มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในคะน้า แต่ก็มีแนวโน้มที่หนอนใยผักจะแสดงความต้านทานได้ในอนาคต และจากการทดลองของ Zhao et.al (2002) พบว่า หนอนใยผัก จากฮาวาย เม็กซิโก และประเทศไทย อ่อนแอต่อ spinosad แต่หนอนใยผักจากฮาวายและประเทศไทยมีแนวโน้มที่จะทนทานต่อ spinosad เช่นเดียวกับ Kao และ Cheng (2001) ได้รายงานว่าหนอนใยผักมีแนวโน้มการต้านทานต่อสารกลุ่มใหม่ อันได้แก่ abamectin, fipronil, chlorfenapyr และ spinosad อย่างช้าๆ สำหรับสาร indoxacarb ซึ่งเป็นสารกลุ่มใหม่ที่พึ่งเริ่มใช้ได้ 1 – 2 ปี จากการทดลองแสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักและยังไม่มีรายงานการต้านทานต่อสาร แต่หากใช้เป็นประจำและต่อเนื่องปัญหาการต้านทานต่อสารก็จะเกิดขึ้นได้ จากปัญหาของการสร้างความต้านทานของหนอนใยผักต่อสารฆ่าแมลง โดยเฉพาะต่อสารฆ่าแมลงกลุ่มใหม่ดังกล่าว การใช้เชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นชีวินทรีย์กำจัดแมลงชนิดหนึ่ง ที่มีความเฉพาะเจาะจงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเท่านั้น ก็จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถชะลอ การต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้ และจากผลการทดลองการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย Centari สลับกับสารฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น abamectin, fipronil, chlorfenapyr และ spinosad ก็แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักได้ไม่แตกต่างจากการใช้สารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ เพียงอย่างเดียว อีกทั้งผลผลิตที่มีคุณภาพระยะเก็บเกี่ยวก็ได้น้ำหนักที่ดี ซึ่งจากรายงานของ Monnerat et.al (2001) ก็ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักและผลผลิตที่ได้ก็มีคุณภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ abamectin ผลผลิตกะหล่ำจะแสดงอาการเป็นพิษ ใบเหลืองและหดสั้น แต่เมื่อฉีดสลับกับเชื้อแบคทีเรียอาการดังกล่าวก็ไม่เกิดขึ้น

จากการตรวจนับจำนวนหนอนใยผักรวม 8 ครั้ง (ก่อนพ่นสารทดลอง 1 ครั้ง และหลังพ่นสารทดลอง 7 ครั้ง) ตาม ตารางที่ 3 พบว่าก่อนพ่นสารทดลองพบหนอนใยผักในทุกกรรมวิธีระหว่าง 6.0-8.7 ตัว ต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 7 ครั้ง พบหนอนใยผักมีความแตกต่างทางสถิติทุกครั้งคือหลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 1 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้นกรรมวิธีพ่นสาร fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG พบหนอนใยผักระหว่าง 1.3-16.3 ตัว ต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 31.1 ตัว ต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร abamectin,chlorfenapyr,spinosad และ spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG พบหนอนใยผัก 11.3,1.3,6.3 และ3.0 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร fipronil,abamectin

สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG ,chlorfenapyr สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG และกรรมวิธีพ่นสาร indoxacarb ที่พบจำนวนหนอนใยผัก 13.3,10.3,10.7,และ 16.3 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับ แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG ที่พบหนอนใยผัก 24.7 ตัว ต่อ 10 ต้น

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 2 กรรมวิธีพ่นสาร abamectin, chlorfenapyr, fipronil, spinosad และ indoxacarb พบหนอนใยผัก 10.0,6.3,16.3,3.7 และ14.3 ตัว ต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 38.0 ตัว ต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร abamectin หรือ chlorfenapyr หรือ fipronilหรือ spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG พบจำนวนหนอนใยผัก 34.0 ,28.0,25.0,และ 22.3 ตัว ต่อ 10 ต้น ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร

หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 2.3-19.0 ตัว ต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 41.3 ตัว ต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร spinosad และ indoxacarb พบหนอนใยผัก 4.0 และ 2.3 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร abamectin,chlorfenapyr, abamectin สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG , chlorfenapyr สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG , fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG และ spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG ที่พบหนอนใยผัก7.7,8.3,10.7,8.3,16.7 และ8.3 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับ แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร fipronil ที่พบหนอนใยผัก 19.0 ตัว ต่อ 10 ต้น

หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 4 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้นกรรมวิธีพ่นสาร fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG พบหนอนใยผักระหว่าง 8.3-35.7 ตัว ต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 65.3 ตัว ต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร chlorfenapyr, spinosad และ indoxacarb พบหนอนใยผัก 8.3,9.3, และ 14.3 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร abamectin และ fipronil ที่พบหนอนใยผัก 20.7 และ 24.3 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับแต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสาร abamectin สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG, chlorfenapyr สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG , fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG และ spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG ที่พบหนอนใยผัก 35.7,33.0,56.3 และ33.0 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับ

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 5,6 และ 7 ทุกกรรมวิธีนี้มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 12.0 - 36.7,2.3 - 10.7 และ1.0 - 6.7 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับน้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 86.7,21.7 และ16.0 ตัว ต่อ 10 ต้น ตามลำดับ

สำหรับผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดนี้มีคุณภาพพบว่าเกิดการเข้าทำลายของโรคเน่าและ (soft rot) อย่างรุนแรงเนื่องจากสภาพอากาศร้อนสลับฝนเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องจึงทำให้เกิดการระบาดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคเน่าและ(นิรนาม,2535 และ นิรนาม ,2545)

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงที่แนะนำ บางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลีพบว่า สารฆ่าแมลง abamectin, chlorfenaypr, fipronil, spinosad, abamectin สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari , chlorfenaypr สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, fipronil สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari, spinosad สลับเชื้อแบคทีเรีย Centari และ indoxacarb มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก และผลผลิตที่ได้ก็มีคุณภาพน้ำหนักมาก ยกเว้น การใช้สารฆ่าแมลง abamectin ที่กะหล่ำปลีแสดงอาการเป็นพิษ ทำให้ใบหดสั้นเหลืองและต้นแคระแกรน จึงได้น้ำหนักผลผลิตน้อยกว่าการใช้สารชนิดอื่น ๆ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกร นักวิชาการเกษตรและผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข จารี เกียรติ์สุพิมล อนันต์ วัฒนธัญกรรม และอวบ สารถ้อย. 2531. ตารางชีวิตของหนอนใยผัก. น. 611 – 644 ใน แมลงและสัตว์ศัตรูพืช 2531. เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงษ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์ อุราพร ใจเพชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนวารี และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์. 2542 แมลงศัตรูผัก. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพฯ. 97 น.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย และ อนันต์ วัฒนธัญกรรม. 2532. การศึกษาระดับความเป็บพิษของสารฆ่าแมลงบางชนิดต่อหนอนใยผัก. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2532. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัจววิทยา กรมวิชาการเกษตร. น. 20 – 24.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2535. แมลงศัตรูพืชตระกลูกะหล่ำและแนวทางการบริหาร. น. 142 – 157. ใน แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

วินัย รัชตปกรณ์ชัย และ ณัฐวัฒน แย้มยิ้ม. 2538. การศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูผักในคะน้า. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2538. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัจววิทยา กรมวิชาการเกษตร. น. 102 – 114.

Kao, C.H. and E.Y. Cheng. 2001. Insecticide resistance in *Plutella xylostella* L. XI. Resistance to newly introduced insecticides in Taiwan. J. of Agri. Res. Of China.

Monnerat, R. G., D. Bordat, M.C. Branco and F.H. Franca. 2001. Effect of *Bacillus thurigiensis* Berliner and chamical insecticides on *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera ; Yponomeutidae) and its parasitoids . Rev.of Agri. Entomol. 89(10) : 1181

Rushtapakornchai W., P. Keinmesuk, A. Vattanatankum, T. Miyata and T. Saito. 1995. Field experiment for candidate insecticides to the diamondback moth. P. 77 – 95. In Management of Brown Planthopper and Resistance of Diamondback Moth. Nagoya University Cooperation Press. Nagoya. Japan.

Zhang,X.Y., H. Jie,Y.C.Yu and X.Yi 2001. Monitoring on resistance of diamondback moth to abamectin and field control experiments in Yunnan, China. Rev.of Agri. Entomol. 90 (5) : 635 – 636

Zhao, J.Z., Y.X.Li, H.L. Collins, L. Gusukumaminuto, R.F.L.Mau,G.D.Thompson, A.M. Shelton. 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae) resistance to spinosad. J.of Econ.Entom. 95 (2):430-436

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนหนอนใยผักที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่างๆ ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – มีนาคม 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนใยผัก (ตัว/10 ต้น)							
		ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นสาร(ครั้งที่)						
			1	2	3	4	5	6	7
abamectin	60	16.7	11.7 a[1/]	9.3 b	17.0 c	12.7 a	5.7 a	3.3 a	6.3 a
chlorfenapyr	40	18.3	3.3 a	2.0 ab	2.0 a	1.3 a	0.3 a	0.3 a	0.0 a
fipronil	60	14.0	6.7 a	3.7 ab	3.3 a	4.0 a	1.3 a	1.3 a	0.3 a
spinosad	20	14.7	7.0 a	1.3 a	6.3 ab	4.0 a	1.3 a	1.0 a	0.0 a
abamectin: Centari WDG [2/]	60:80	15.3	9.7 a	7.0 ab	11.0 bc	9.7 a	3.0 a	3.7 a	7.0 a
chlorfenapyr: Centari WDG [2/]	40:80	14.7	3.0 a	3.0 ab	6.0 ab	5.7 a	1.3 a	0.0 a	0.0 a
fipronil: Centari WDG [2/]	60:80	17.0	8.0 a	5.7 ab	7.7 ab	6.3 a	2.0 a	0.3 a	0.0 a
spinosad: Centari WDG [2/]	20:80	17.7	8.0 a	7.7 ab	11.3 bc	8.3 a	2.3 a	1.0 a	0.0 a
indoxacarb	15	21.0	6.7 b	4.0 ab	2.3 a	2.3 a	0.7 a	0.3 a	0.0 a
control	-	18.3	36.3	57.0 c	85.0 d	121.7 b	154.0 b	95.0 b	58.7 b
CV(%)		31.2	51.4	39.0	23.3	31.0	18.2	22.8	49.1
RE(%)		-	-	61.3	23.4	14.2	18.4	3.1	5.5

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

[2/] พ่นสารฆ่าแมลงสลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 2 ผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดในกรรมวิธีทดสอบต่างๆ ที่ อ.ท่าม่วง ระหว่างเดือนมกราคม – มีนาคม 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ตารางเมตร)
abamectin	60	5.4 d[1/]
chlorfenapyr	40	9.2 a
fipronil	60	8.9 ab
spinosad	20	8.4 b
abamectin/ Centari WDG[2/]	60/80	7.2 c
chlorfenapyr/ Centari WDG[2/]	40/80	8.9 ab
fipronil/Centari WDG[2/]	60/80	8.6 ab
spinosad/ Centari WDG[2/]	20/80	8.3 b
indoxacarb	15	9.0 ab
control	-	0.0 e
CV(%)		5.5

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนหนอนใยผักที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่างๆที่ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมิถุนายน – สิงหาคม 2546

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม / น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนใยผัก (ตัว / 10 ต้น)							
		ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นสาร (ครั้งที่)						
			1	2	3	4	5	6	7
abamectin	60	6.0	11.3 a[1/]	10.0 abc	7.7 ab	20.7 ab	27.7 a	3.0 a	3.0 a
chlorfenapyr	40	7.3	1.3 a	6.3 ab	8.3 ab	8.3 a	25.3 a	4.7 a	3.3 a
fipronil	60	8.0	13.3 ab	16.3 a-d	19.0 b	24.3 ab	36.7 a	10.7 a	6.7 a
spiinosad	20	7.3	6.3 a	3.7 a	4.0 a	9.3 a	12.0 a	4.3 a	2.1 a
abamectin : Centari WDG[2/]	60 : 80	8.7	10.3 ab	34.0 e	10.7 ab	35.7 b	18.3 a	3.7 a	2.1 a
chlorfenapyr : Centari WDG[2/]	40 : 80	7.7	10.7 ab	28.0 de	8.3 ab	33.0 b	10.7 a	3.3 a	2.0 a
fipronil : Centari WDG[2/]	60 : 80	7.7	24.7 bc	25.0cde	16.7 ab	56.3 c	31.3 a	3.0 a	3.0 a
spiinosad : Centari WDG[2/]	20 : 80	6.3	3.0 a	22.3 b-e	8.3 ab	33.0 b	18.0 a	8.0 a	3.0 a
indoxacarb	15	7.3	16.3 ab	14.3 a-d	2.3a	14.3 a	14.3 a	2.3 a	1.0 a
control	-	8.3	31.3 c	38.0 e	41.3 c	65.3 c	86.7 b	21.7 b	16.0 b
CV (%)		37.9	60.6	40.4	59.9	29.6	50.4	90.2	44.4
RE (%)		-	-	95.5	72.8	67.22	56.4	71.8	135.5

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT.
[2/] พ่นสารฆ่าแมลงสลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย

ประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลี

Efficacy of Bactericides for Controlling Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) on Cabbage

สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ปิยรัตน์ เขียนมีสุข

อัจฉรา ตันติโชดก

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่แนะนำบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลีที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือน มกราคม – มีนาคม 2546 วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธีคือ พ่นสารเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, Delfin WG, Florbac WDG, Centari WDG, Dipel WP, Florbac FC, DOA.Bt.1, DOA.Bt.2 และสารฆ่าแมลง fipronil อัตรา 80 กรัม, 80 กรัม, 80 กรัม, 80 กรัม, 100 กรัม, 100 มล., 100 มล.,100 มล. และ 60 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับและกรรมวิธีไม่พ่นสาร พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้เชื้อแบคทีเรียและสารฆ่าแมลงพบหนอนใยผัก 0.0 – 34.0 ตัวต่อ10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 23.0 – 86.0 ตัวต่อ 10 ต้น และผลผลิตที่ได้ในทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อแบคทีเรียและสารฆ่าแมลง ได้ผลผลิต 5.3 – 8.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สารที่ได้ผลผลิต 0.2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ยกเว้น กรรมวิธีใช้เชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 ได้ผลผลิตไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร

ทะเบียนวิจัยที่ 4506006024

คำนำ

พืชผักตระกูลกะหล่ำ (*Crucifers, Brassica* spp) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกประมาณ 343,000 ไร่ เนื่องจากเป็นพืชผักที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวันจึงมีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดรอบ ๆ กรุงเทพฯ พืชผักตระกูลนี้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาวขาวปลี คะน้ำ ผักกาดหัว กวางตุ้ง และบร๊อคโคลี่ เป็นต้น (ปิยรัตน์ และคณะ,2542) ปัญหาการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำที่สำคัญ คือ แมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ และด้วงหมัดผัก เป็นต้น

หนอนใยผัก (diamondback moth ; *Plutella xylostella* Linn.) เป็นหนอนผีเสื้อที่สำคัญที่สุด ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชผักตระกูลกะหล่ำ มักพบระบาดทั่วไปตามแหล่งปลูกผัก โดยเฉพาะแหล่งปลูกผักเพื่อเป็นการค้า ทั้งนี้เนื่องจากหนอนชนิดนี้มีวงจรชีวิตสั้น มีการแพร่พันธุ์และขยายพันธุ์รวดเร็ว (ปิยรัตน์และคณะ , 2542) ปิยรัตน์และคณะ (2531) ได้รายงานว่าวงจรชีวิตของหนอนใยผักในเดือนเมษายน – พฤษภาคม มีระยะเวลา 17-18 วัน และ 29 วัน ในเดือน พฤศจิกายน – ธันวาคม หรือใน 1 ปีจะมี 17 – 25 ชั่วอายุขัย จึงมักพบหนอนใยผักระบาดรวดเร็วและรุนแรงเสมอในเขตเกษตรที่ราบทั่วๆไป อีกทั้งหนอนใยผักมีการพัฒนาการวางไข่ได้เร็วคือ หลังออกจากดักแด้ภายใน 1 วัน สามารถวางไข่ได้ทันทีและวางไข่ได้ตลอดชีวิต ประกอบกับสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม และมีพืชอาหารตลอดปี อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบดีว่าหนอนใยผักมีการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้เร็วและมากมายหลายชนิด (วินัย,2535 และ Rushtapakornchai *et al.,* 1995) โดยเฉพาะแหล่งปลูกผักแบบการค้าที่มีการปลูกผักต่อเนื่องตลอดปี ซึ่งมีการใช้สารฆ่าแมลงมากและบ่อยครั้ง จึงเป็นการยากต่อการป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารฆ่าแมลงฉีดพ่นเป็นประจำเพียงชนิดเดียว Li et.al (2001) ได้รายงานว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ kurstaki และสายพันธุ์ aizawai มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักและหนอนกระทู้หอม เช่นเดียวกับ วินัยและณัฐวัฒน์ (2538) พบว่า เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ kurstaki และสายพันธุ์ aizawai แสดงประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในคะน้าแตกต่างกันที่อัตราการใช้ต่างๆ ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียที่แนะนำบางชนิดในสายพันธุ์ต่างๆ กันก็จะเป็นแนวทางการเลือกใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือช่วยชลอหรือลดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผัก และที่สำคัญเชื้อแบคทีเรียไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้และไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต ซึ่งจะช่วยลดปัญหาสารพิษตกค้างจากการใช้สารฆ่าแมลงลงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี (Speed 047)
2. สารฆ่าแมลง fipronil (Ascend 5%SC)
3. เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* var kuristaki (Bactospeine HP, Delfin WG, Dipel WG, Bt1-DOA)และ *Bacillus thuringiensis* var aizawai (Centari EDG,Florbac WDG, Bt2-DOA)
4. สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb (Pencozeb 80 % WP)
5. เครื่องพ่นสารแบบโยกสะพายหลัง
6. ปุ๋ยเคมีสูตร 20-20-0,15-15-15
7. ปุ๋ยทางใบ (Sorba-spray CaB)

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Bactospeine HP)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Delfin WG)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Florbac WDG)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Centari WDG)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Dipel WG)	อัตรา 100 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Florbac FC)	อัตรา 100 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Bt1-DOA)	อัตรา 100 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Bt2-DOA)	อัตรา 100 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 9	พ่น fipronil (Ascend 5%SC)	อัตรา 60 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 10	ไม่ใช้สารฆ่าแมลง	

ดำเนินการทดลองที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – มีนาคม 2546 โดยทำการย้ายกล้ากะหล่ำปลีอายุ 25 วัน ลงในแปลงทดลอง ซึ่งมีขนาดแปลงย่อย 1.4 x 15 เมตร ระยะปลูกระหว่างแถว 40 เซนติเมตร ระหว่างต้น 30 เซนติเมตร เริ่มพ่นสารทดลองตามกรรมวิธีครั้งแรก เมื่อพบหนอนใยผัก เฉลี่ย 1 ตัวต่อต้น โดยพ่นสารทดลองทุก 5 วัน จำนวน 7 ครั้ง ตรวจนับจำนวนหนอนใยผักทุกครั้งก่อนพ่นสารทดลองโดยวิธีสุ่มตรวจนับจากกะหล่ำปลี จำนวน 10 ต้นต่อแปลงย่อย และทำการเปรียบเทียบน้ำหนักและคุณภาพผลผลิตระยะส่งตลาดของกะหล่ำปลี จากการสุ่มกะหล่ำปลีในพื้นที่ 1.0 ตารางเมตร เมื่อกะหล่ำปลีอายุได้ 65 วัน หลังย้ายกล้าและนำข้อมูลที่ทำการบันทึกไว้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจนับจำนวนหนอนใยผัก รวม 8 ครั้ง (ก่อนพ่นสารทดลอง 1 ครั้งและหลังพ่นสารทดลอง 7 ครั้ง) ตาม Table 1. พบว่าก่อนพ่นสารทดลองพบหนอนใยผักในทุกกรรมวิธี ระหว่าง 11.7 – 18.3 ตัวต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 7 ครั้ง พบหนอนใยผักมีความแตกต่างทางสถิติทุกครั้ง คือ หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 1 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 3.0 – 15.3 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ที่พบหนอนใยผัก 29.0 ตัว ต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง fipronil พบ หนอนใยผัก 3.0 ตัวต่อ 10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อแบคทีเรีย ยกเว้น กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG ที่พบหนอนใยผัก 7.7 ตัวต่อ 10 ต้น ขณะที่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP,Florbac WDG และ Florbac FC พบหนอนใยผัก 13.7, 10.7 และ 11.0 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG.

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 2 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 8.3 – 26.0 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 49.3 ตัวต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสาร fipronil พบหนอนใยผัก 8.3 ตัว ต่อ 10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นเชื้อแบคทีเรีย ยกเว้น กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG และ Florbac WDG ที่พบหนอนใยผัก 13.7 และ 13.7 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 พบหนอนใยผัก 26.0 และ 23.7 ตัวต่อ 10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Centari WDG และ Florbac WDG แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, Delfin WG, Dipel WP และ Florbac FC ที่พบหนอนใยผัก 17.7, 20.0, 22.7 และ 21.7 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 3 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสาร ยกเว้นกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 พบหนอนใยผักระหว่าง 0.3 – 6.0 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 23.0 ตัวต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง fipronil พบจำนวนหนอนใยผัก 0.3 ตัวต่อ 10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 ที่พบจำนวนหนอนใยผัก 13.3, 17.0 และ 15.3 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Delfin WG, Florbac WDG ,Dipel WP และ Florbac FC พบหนอนใยผัก 6.0, 4.7, 4.3 และ 6.0 ตัวต่อ 10 ต้นตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 4 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้นกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 พบหนอนใยผักระหว่าง 1.3–17.0 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 31.0 ตัวต่อ 10 ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง fipronil พบจำนวนหนอนใยผัก 1.3 ตัวต่อ 10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, Delfin WG,DOA.Bt.1

และ DOA.Bt.2 ที่พบจำนวนหนอนใยผัก 17.0, 15.0,24.0 และ 24.0 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Florbac WDG , Centari WDG, Dipel WP และ Florbac FC ที่พบหนอนใยผัก 10.3, 7.3, 7.3 และ 9.0 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, Delfin WG,

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 5 และ 6 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 0.3 – 34.0 ตัว ต่อ 10 ต้น และ 0.0 – 33.0 ตัว ต่อ 10 ต้น ในครั้งที่ 5 และ 6 ตามลำดับ น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 86.0 ตัว ต่อ 10 ต้น และ 45.7 ตัวต่อ 10 ต้น ในครั้งที่ 5 และ 6 ตามลำดับ โดยกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, Delfin WG, Florbac WDG, Centari WDG, Dipel WP และ Florbac FC พบจำนวนหนอนใยผัก 11.7 , 10.0 ,6.0, 4.7, 8.0 และ 12.3 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับในครั้งที่ 5 และพบหนอนใยผัก 10.7, 8.0, 4.7,4.0,8.7 และ 5.0 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับในครั้งที่ 6 แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 ที่พบจำนวนหนอนใยผัก 28.0 และ 34.0 ตัวต่อ 10 ต้นตามลำดับในครั้งที่ 5 และพบหนอนใยผัก 29.0 และ 33.0 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับในครั้งที่ 6

หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 7 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารพบหนอนใยผักระหว่าง 0.0 – 9.3 ตัวต่อ 10 ต้น น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่พบหนอนใยผัก 25.7 ตัวต่อ 10 ต้น

สำหรับผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดที่มีคุณภาพตาม Table 2 พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้นกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 ได้น้ำหนักผลผลิตระหว่าง 5.3 – 8.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร มากกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาที่ได้น้ำหนักผลผลิต 0.2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร โดยกรรมวิธีพ่นสาร fipronil ได้น้ำหนักผลผลิตสูงสุด 8.4 กิโลกรัม/ตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP, Delfin WG, DOA.Bt.1 และ DOA.Bt.2 ที่ได้น้ำหนักผลผลิต 5.3, 5.9, 1.1 และ 0.8 กิโลกรัมต่อ ตารางเมตร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Florbac WDG, Centari WDG, Dipel WP และ Florbac FC ที่ได้น้ำหนักผลผลิต 7.4, 7.8,7.5 และ 6.5 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ขณะที่กรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Bactospeine HP ได้น้ำหนักผลผลิตน้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Florbac WDG, Centari WDG และ Dipel WP แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรีย Delfin WG และ Florbac FC

จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่แนะนำในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* ได้แก่ Bactospeine HP, Delfin WG และ Dipel WP และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* ได้แก่ Florbac WDG, Centari WDG และ Florbac FC มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก เช่นเดียวกับรายงานของ Li et. al (2001) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subspp *kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis* subspp *aizawai* มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักและหนอนกระทู้หอมที่เป็นศัตรูสำคัญในพืชผักตระกูลกะหล่ำ สอดคล้องกับ Shama et. al (2001) ได้ทดลองในห้องปฏิบัติกรพบว่า หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนเจาะสมอ

ฝ้าย มีอัตราการตายภายใน 48 ชั่วโมง หลังได้รับเชื้อ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* เท่ากับ 85.4 – 98.9, 93.7- 100 และ 72.4 –75.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้งนี้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนผีเสื้อศัตรูพืชของเชื้อแบคทีเรียมีข้อจำกัดในเรื่องความคงทน Pokharkar et. al (2002) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก แต่มีความคงทนในพืชไม่เกิน 5 วัน ในสภาพธรรมชาติเชื้อแบคทีเรียจะมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก ลดลง อันเนื่องมาจากรังสีอุลตร้าไวโอเลตจากแสงอาทิตย์ และปริมาณน้ำฝน ซึ่งข้อจำกัดเหล่านี้แก้ไขได้โดยการใส่สารจับใบและผสมสารป้องกันแสงแดด รวมทั้งเวลาที่พ่นเชื้อแบคทีเรียควรพ่นเวลาบ่าย 3 โมงไปแล้ว เพื่อหลีกเลี่ยงรังสีอุลตร้าไวโอเลต ซึ่งจะช่วยให้เชื้อแบคทีเรียคงอยู่บนใบพืชได้นานขึ้น (Tamez et.al (2000) และ อัจฉรา (2544)) นอกจากนี้ปริมาณสปอร์และผลึกสารพิษยังมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จากรายงานของ Monnerat et. al (1999) ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* นอกจากจะขึ้นอยู่กับอัตราการใช้และความคงทนในสภาพแวดล้อมของผลึกสารพิษแล้วยังขึ้นอยู่กับชนิดของผลึกสารพิษ ซึ่งมีผลต่อหนอนใยผักในเวลาที่ต่างกัน เช่นเดียวกับ Mohan และ Gujar (2001) ได้ทดสอบความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียต่อหนอนใยผัก พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ประกอบด้วยผลึกสารพิษ Cry1 Ab แสดงความเป็นพิษต่อหนอนใยผักขณะที่ผลึกสารพิษ Cry1 Aa ไม่แสดงความเป็นพิษต่อหนอนใยผัก

Singh et. al (2000) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 0.5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร ทำให้หนอนใยผักวัย 1 และ 3 มีอัตราการตาย 100 และ 92.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.0 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร อัตราการตายของหนอนใยผักวัย 3 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1 (*Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*) และ DOA .Bt.2 (*Bacillus thuringiensis* var *aizawai*) มีความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่ทำเป็นการค้ามีความเข้มข้นของจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมากกว่า $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่า 100 เท่า ดังนั้นประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย DOA. Bt1 และ DOA. Bt2 ในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักจึงค่อนข้างต่ำกว่าเชื้อแบคทีเรียการค้าอันได้แก่ Bactospeine HP, Delfin WG , Dipel WP, Florbac WDG, Centari WDG และ Florbac FC และจากปัญหาของการสร้างความต้านทานของหนอนใยผักต่อสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ เช่น กลุ่มออร์แกนโนฟอสเฟต กลุ่มคาร์บาเมท กลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ และกลุ่มยับยั้งการเจริญเติบโต การใช้เชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นชีวินทรีย์กำจัดแมลงชนิดหนึ่งที่มีความเฉพาะเจาะจงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเท่านั้นก็จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะสามารถชลอความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้ และจากผลการทดลองฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* อันได้แก่ Florbac WDG, Centari WDG และ Florbac FC และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* อันได้แก่ Dipel WP แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก อีกทั้งผลผลิตที่มีคุณภาพระยะเก็บเกี่ยวก็ได้น้ำหนักที่ดีไม่แตกต่างจากการฉีดพ่นสารฆ่าแมลง fipronil (Ascend) เพียงอย่างเดียว จากรายงานของ Monnerat et. al (2001) การพ่นเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus thuringiensis var *kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* ได้ผลผลิตระยะส่งตลาดที่มีคุณภาพของกะหล่ำปลี 85-100 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งการพ่นด้วยเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ทั้ง 2 ชนิด พบจำนวน พาราไซด์ของหนอนใยผัก 35.7-60.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้งนี้การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายสูง จึงไม่สามารถใช้กับแมลงศัตรูพืชที่พบว่ามีการระบาดในแปลงหลายๆ ชนิด จึงจำเป็นต้องศึกษาก่อนว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดใด และช่วงเวลาใดก่อนนำไปใช้ ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุด และหากมีการใช้ไม่ถูกต้องอย่างต่อเนื่องแมลงศัตรูพืชก็อาจพัฒนาสร้างความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียขึ้นมาได้ และจากรายงานของ He et. al (2002) พบว่าหนอนใยผักแมลงศัตรูพืชตระกูลกะหล่ำได้ต้านทานต่อสารฆ่าแมลงมากกว่า 50 ชนิด รวมทั้งเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เช่นเดียวกับ Maruyama et. al (2000) ได้ทดลองเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* กับหนอนใยผักในแหล่งปลูกผัก 8 แห่งที่มีการใช้สารฆ่าแมลง และเชื้อแบคทีเรียพบว่า ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* และ *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* แตกต่างกันไปตามแหล่งปลูกผักที่แตกต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียที่แนะนำบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลี พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* ได้แก่ Bactospeine HP, Delfin WG และ Dipel WP, และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* ได้แก่ Florbac WDG, Centari WDG และ Florbac FC มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก และผลผลิตที่ได้ก็มีคุณภาพน้ำหนักมาก ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1(*Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*) และ DOA.Bt.2 (*Bacillus thuringiensis* var *aizawai*) ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก และผลผลิตที่ได้ก็ไม่มีคุณภาพ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการผลิตเชื้อแบคทีเรีย DOA.Bt.1และ DOA.Bt.2 สามารถผลิตจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียได้ $1x10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่เชื้อแบคทีเรียที่ทำเป็นการค้ามีจำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียมากกว่า $1x10^{10}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมากกว่า 100 เท่า จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักแตกต่างกัน

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกร นักวิชาการเกษตรและผู้ร่วมงานทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข จารี เกียรติ์สุพิมล อนันต์ วัฒนธัญกรรมและอวบ สารถ้อย . 2531. ตารางชีวิตของหนอนใยผัก. น. 611 – 644 ใน แมลงและสัตว์ศัตรูพืช 2531 . เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 6. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงศ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ อุราพร ใจเพ็ชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนวารีและสัจจะ ประสงค์ทรัพย์ . 2542. แมลงศัตรูผัก. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่ง. ประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพฯ 97 น.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2535. แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำและแนวทางการบริหาร. น. 142 – 157 ใน แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย และณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม. 2538. ผลของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ต่อแมลงศัตรูผักที่สำคัญในคะน้า. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2538. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผัก ไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. น. 102 – 114.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที : การควบคุมแมลงศัตรูพืช. น. 183 – 208 ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

He.Y.X., Y.X. Juan and W.O. Yong. 2002. Advances in studies on the insecticide resistance of *Plutella xylostella* (L.) and its management. Rev.of Agri.Entomol. 90 (9) : 1238

Li. J.H., W.Q. ying, W. Mo, K.S. Kwon and Y.Z. Niu. 2001. Chracteristics of two new isolates of *Bacillus thuringiensis*. Rev.of Agri. Entomol. 89 (6) : 696

Maruyama, T., S. W. Yanagisawa, T. Iwasa and K. Sabanaka. 2000. Laborctory evaluations for the sensitivities to commercial *Bacillus thuringiensis*. Products (BT insecticide) in diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*) collected from eastern Nagano. Rev.of Agri. Entomol. 88 (6) : 783

Mohan, M. and G. T. Gujar. 2001. Toxicity of *Bacillus thuringiensis*. Strains and commecial formulations to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) Crop Protection. 20 (4) : 311 – 316

Monnerat. R.G., L. Masson, R. Brousseau, C.M. Pusztai, D.Bordat and R. Frutos. 1999. Differential activity and activation of *Bacillus thuringiensis* insectidal proteins in diamondback moth , *Plutella xylostella* . Current Microbiology. 39 (3) : 159 - 162

Monnerat. R.G., D. Bordat, M.C. Branco and F.H. Franca. 2001. Effect of *Bacillus thuringiensis* Berliner and chemical insecticides on *Plutella xylostella* (L.) (Lepi : Yponomeutidae) and its parasitoids. Rev. of Agri. Entomol. 89 (10) : 1181

Pokharkar, D. S., A. B. Hadapad and T. R. Puranik. 2002. Bioassay and persistance of *Bacillus thuringiensis* Berliner against *Plutella xylostella* (Linn.) on cabbage. Ann.of Plant Protection Sciences. 10 (1): 1-4

Rushtapakornchai W., P. Keinmesuk, A. Vattanatankum, T. Miyata and T. Saito. 1995. Field experiment for candidate insecticides to the diamondback moth. P. 77 – 95 . In Management of Brown Planthopper and Resistance of Diamondback moth. Nagoya University Cooperation Press. Nagoya. Japan.

Shama. S.S., H.D. Kaushik and V.K. Kalra. 2001. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* varieties kurstaki and aizawai against some lepidopterous pests. Ann> of Bio. 17 (1) : 91 - 94

Singh. S.P., S.K. Jalali and T. Venkatesan. 2000. Susceptibility of diasmondback moth and its egg parasitoid to a new *Bacillus thuringiensis* formulation. Pest Management in Horticultural Ecosystems. 6 (2) : 114 – 117

Tamez. G.P., McGuire. M.R., R.W. Behle, B.S. Shasha and L.J.G. Wong. 2000. Assesment of Microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis* . J. of Econ. Entomol. 93 (2) : 219 – 225

ตารางที่1 เปรียบเทียบจำนวนหนอนใยผักที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่างๆ ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม-มีนาคม 2546

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนใยผัก (ตัว/10 ต้น)							
		หลังพ่นสาร(ครั้งที่)							
		ก่อนพ่นสาร	1	2	3	4	5	6	7
Bactosprine HP	80	8.0	17.3 [1/]	32.3 a-d	36.0 ab	56.7 bc	57.0 bcd	18.7 a	4.7 a
Delfin WG	80	6.7	15.0	30.3 a-d	28.7 ab	52.7 abc	47.0 abc	15.0 a	3.6 a
Florbac WDG	80	6.3	16.0	22.7 ab	23.0 a	39.3 ab	30.7 ab	10.3 a	2.0 a
Centari WDG	80	7.3	14.3	27.3 abc	26.7 a	35.3 ab	36.3 ab	9.0 a	2.7 a
Dipel WP	100	7.7	20.3	23.7 ab	23.0 a	45.3 abc	42.0 ab	11.3 a	3.3 a
Flobac FC	100	5.7	18.3	25.3 ab	30.0 ab	53.7 abc	40.0 ab	13.3 a	5.0 a
DOA. Bt.1	100	9.3	26.7	44.7 cd	46.3 bc	68.7 cd	69.7 cd	36.0 b	10.3 b
DOA. Bt.2	300	9.0	24.3	39.3 bcd	46.0 bc	65.3 cd	74.3 d	40.3 b	9.3 b
fipronil	60	9.0	13.0	19.3 a	21.7 a	31.7 a	28.3 a	10.3 a	3.0 a
control	-	8.7	35.3	47.0 d	56.3 c	81.3 d	111.3 e	44.7 b	15.7 c
CV(%)		20.5	42.0	32.9	28.5	22.5	27.6	29.2	32.9
RE(%)				86.4	84.3	76.2	75.8	66.8	66.0

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 2 ผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดในกรรมวิธีทดสอบต่างๆ ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมกราคม – มีนาคม 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ผลผลิต (กิโลกรัม/ตารางเมตร)
Bactosprine HP	80	5.3 c[1/]
Delfin WG	80	5.9 bc
Fforbac WDG	80	7.4 ab
Centari WDG	80	7.8 ab
Dipel WP	100	7.5 ab
Flobac FC	100	6.5 abc
DOA. Bt.1	100	1.1 d
DOA. Bt.2	100	0.8 d
fipronil	60	8.4 a
control	-	0.2 d
CV(%)		22.4

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงเพื่อป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำ

Efficacy of Insecticides Againast Cabbage Webworm,

Hellula undalis (Fabicius)

สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น สัจจะ ประสงค์ทรัพย์

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงที่แนะนำบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดในกะหล่ำปลีที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงทดลองที่ 1 ระหว่างเดือน มิถุนายน-สิงหาคม 2545 และแปลงทดลองที่ 2 ระหว่างเดือน พฤษภาคม-กรกฎาคม 2546 วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธีคือ พ่นสารฆ่าแมลง beta-cyfluthrin (Folitec 2.5%EC) , beta-cyfluthrin (Chix 5%EC), cypermethrin/phosalone (Parzon 6.25/22.5%EC) , deltamethrin (Decis 3%EC) , deltamethrin (Decis 25%Tablet WP), fipronil (Ascend 5%SC) , lambda-cyhalothrin (Karate 2.5%EC) , profenofos (Supercron 50%EC) , prothiofos (Tokuthion 50%EC) อัตรา 30 มล., 30 มล., 40 มล., 30 มล., 4 เม็ด, 40 มล., 40 มล. , 40 มล. และ 40 มล ต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับและกรรมวิธีไม่พ่นสาร แปลงทดลองที่1 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้น cypermethrin/phosalone , deltamethrin, fipronil พบจำนวนหนอนเจาะยอด 0.0-4.5 ตัวต่อ 10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่ พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำ 3.7-7.2 ตัวต่อ 10 ต้น และทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้น fipronil พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีถูกทำลาย 3.0-11.0 ต้น ต่อแปลงย่อย แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีถูกทำลาย 8.7-17.7 ต้น ต่อแปลงย่อย ผลผลิตทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้น cypermethrin/phosalone , deltamethrin, fipronil ได้ผลผลิต 4.7-5.7 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ได้ผลผลิต 3.2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แปลงทดลองที่ 2 ทุกกรรมวิธีที่มีการพ่นสารยกเว้น cypermethrin/phosalone และ fipronil พบหนอนเจาะยอด 0.0-6.7 ตัวต่อ 10 ต้น และจำนวนต้นกะหล่ำปลีถูกทำลาย 0.0-7.0 ต้น ต่อแปลงย่อย และได้ผลผลิต 5.4-7.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารที่ พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำ 1.7-9.7 ตัวต่อ 10 ต้น และจำนวนต้นกะหล่ำปลีถูกทำลาย 4.3-11.3 ต้น ต่อแปลงย่อย และได้ผลผลิต 3.9 กิโลกรัมต่อตารางเมตร

ทะเบียนวิจัยที่ 4506006025

คำนำ

พืชผักตระกูลกะหล่ำ (*Crucifers, Brassica* spp) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกประมาณ 343,000 ไร่ เนื่องจากเป็นพืชผักที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวันจึงมีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดรอบ ๆ กรุงเทพฯ พืชผักตระกูลนี้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาวขาวปลี คะน้ำ ผักกาดหัว กวางตุ้ง และบร๊อคโคลี่ เป็นต้น (ปิยรัตน์ และคณะ,2542) ปัญหาการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำที่สำคัญ คือ แมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ และด้วงหมัดผัก เป็นต้น

หนอนเจาะยอดกะหล่ำ (Cabbage webworm : *Hellula undalis* (Fabricius)) พบระบาดทำความเสียหายโดยหนอนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ จะเจาะเข้าไปกัดกินในส่วนยอดที่กำลังเจริญเติบโต ทำให้ยอดขาด ไม่เข้าปลี หรือกัดกินลำ ต้น ก้านดอก หรือเจาะเข้าไปทำลายใต้ผิวใบผัก ทำให้พืชไม่เจริญเติบโตแตกแขนง และมักพบเก็นรอยกัดกินเป็นทาง หรือมูลตามลำต้น โดยหนอนจะถักใยคลุมตัวและกัดกินอยู่ภายใน และมักพบระบาดค่อนข้างสูงในช่วงฤดูแล้ง ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำปลี โดยเฉพาะหนอนเจาะยอดกะหล่ำผีเสื้อศัตรูที่สำคัญดังกล่าว ก็จะเป็นแนวทางการเลือกใช้สารฆ่าแมลงได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพและที่สำคัญ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถชะลอ หรือลดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลง รวมทั้งลดปัญหาสารพิษตกค้างจากการใช้สารฆ่าแมลงลงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี (Speed 047)
2. สารฆ่าแมลง beta-cyfluthrin (Folitec 2.5%EC) , beta-cyfluthrin (Chix 5%EC), cypermethrin/phosalone (Parzon 6.25/22.5%EC) , deltamethrin (Decis 3%EC) , deltamethrin (Decis 25%Tablet WP), fipronil (Ascend 5%SC) , lambda-cyhalothrin (Karate 2.5%EC) , profenofos (Supercron 50%EC) , prothiofos (Tokuthion 50%EC)
2. สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb (Pencozeb 80 % WP)
3. เครื่องพ่นสารแบบโยกสะพายหลัง
4. ปุ๋ยเคมีสูตร 20-20-0,15-15-15
5. ปุ๋ยทางใบ (Sorba-spray CaB)

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่น beta-cyfluthrin (Folitec 2.5%EC) อัตรา 30 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่น beta-cyfluthrin (Chix 5%EC) อัตรา 30 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่น cypermethrin/phosalone (Parzon 6.25/22.5%EC) อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่น deltamethrin (Decis 3%EC) อัตรา 30 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่น deltamethrin (Decis 25%Tablet WP) อัตรา 4 เม็ด / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 พ่น lambda-cyhalothrin (Karate 2.5%EC) อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่น fipronil (Ascend 5%SC) อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 พ่น profenofos (Supercron 50%EC) อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 9 พ่น prothiofos (Tokuthion 50%EC) อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 10 ไม่ใช้สารฆ่าแมลง

ดำเนินการทดสอบที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงทดลองที่ 1 ระหว่างเดือนมิถุนายน-สิงหาคม 2545 และแปลงทดลองที่ 2 ระหว่างเดือน พฤษภาคม-กรกฎาคม 2546 โดยทำการย้ายกล้ากะหล่ำปลีอายุ 25 วัน ลงในแปลงทดลอง ซึ่งมีขนาดแปลงย่อย 1.4 x 15 เมตร ระยะปลูกระหว่างแถว 40 เซนติเมตร ระหว่างต้น 30 เซนติเมตร เริ่มพ่นสารทดลองตามกรรมวิธีครั้งแรก เมื่อพบหนอนเจาะยอดกะหล่ำ เฉลี่ย 1 ตัวต่อต้น โดยพ่นสารทดลองทุก 5 วัน จำนวน 7 ครั้ง ตรวจนับปริมาณหนอนหนอนเจาะยอดกะหล่ำ ทุกครั้งก่อนพ่นสารทดลองโดยวิธีสุ่มตรวจนับจากกะหล่ำปลี จำนวน 10 ต้นต่อแปลงย่อย และทำการเปรียบเทียบน้ำหนักและคุณภาพผลผลิตระยะส่งตลาดของกะหล่ำปลี จากการสุ่มกะหล่ำปลีในพื้นที่ 1.0 ตารางเมตร เมื่อกะหล่ำปลีอายุได้ 65 วัน หลังย้ายกล้าและนำข้อมูลที่ทำการบันทึกไว้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลอง

แปลงทดลองที่ 1 มิถุนายน-สิงหาคม 2545

จากการตรวจนับหนอนเจาะยอดกะหล่ำ รวม 5 ครั้ง (ก่อนการพ่นสารทดลอง 1 ครั้ง) และหลังการพ่นสารทดลอง 4 ครั้ง) ตามตารางที่ 1 พบว่า ก่อนการพ่นสารทดลองพบจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำในทุกกรรมวิธีระหว่าง 0.7-1.7 ตัวต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 4 ครั้ง พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำมีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1-3 คือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารพบหนอนเจาะยอดกะหล่ำระหว่าง 1.7-3.0, 3.2-4.5 และ 0.0-2.0 ตัวต่อ10 ต้น หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1,2 และ 3 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร ซึ่งพบหนอนเจาะยอดกะหล่ำ 6.7, 7.2 และ 3.7 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ ยกเว้นกรรมวิธีพ่น deltamethrin (tablet) พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำ 6.1 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 2 และ กรรมวิธีพ่น cypermethrin/phosalone, deltamethrin และ fipronil พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำระหว่าง 5.7-7.1 และ 2.7-4.0 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งไม่

แตกต่างทางสถิติกับไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีพ่น profenofos มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำ และไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่น prothiofos, lambda-cyhalothrin, beta-cypermethrin และ beta-cyfluthrin หลังการพ่นครั้งที่ 1-4 สำหรับการตรวจนับจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลาย ตามตารางที่ 2 พบว่า ก่อนพ่นสารทดลองพบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดทำลายในทุกกรรมวิธี ระหว่าง 4.0-5.7 ต้นต่อแปลงย่อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 4 ครั้ง พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายมีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นครั้งที่ 2-4 คือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารพบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายระหว่าง 6.7-11.0, 3.3-5.3 และ 3.0-4.7 ต้นต่อแปลงย่อย หลังการพ่นครั้งที่ 2,3 และ 4 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร ซึ่งพบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายระหว่าง 17.7, 8.7 และ 9.3 ต้นต่อแปลงย่อย ยกเว้นกรรมวิธีพ่น fipronil พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลาย 12.3 และ 7.7 ต้นต่อแปลงย่อย หลังการพ่นครั้งที่ 2 และ 3 ตามลำดับ และกรรมวิธีพ่น cypermethrin/phosalone และ deltamethrin พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลาย 7.0 และ 6.3 ต้นต่อแปลงย่อยหลังการพ่นครั้งที่ 3 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีพ่น profenofos มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำเข้าทำลายต้นกะหล่ำปลี และไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่น prothiofos, lambda-cyhalothrin, beta-cyfluthrin, beta-cypermethrin และ deltamethrin (tablet) หลังการพ่นครั้งที่ 1-4

เมื่อพิจารณาผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดที่มีคุณภาพก็ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณหนอนเจาะยอดกะหล่ำและจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกทำลาย กล่าวคือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารได้ ผลผลิตระหว่าง 4.6-5.7 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สารที่ได้ผลผลิต 3.2 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ยกเว้นกรรมวิธีพ่น cypermethrin/phosalone, deltamethrin และ fipronil ได้ผลผลิต 4.1, 4.1 และ 3.8 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการ ไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ กรรมวิธีพ่น profenofos ได้ผลผลิต 5.7 กิโลกรัมต่อ ตารางเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่น prothiofos, lambda-cyhalothein และ beta-cypermethrin ได้ผลผลิต 5.4, 5.2 และ 5.0 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

3.2 แปลงทดลองที่ 2 พฤษภาคม-กรกฎาคม 2546

จากการตรวจนับจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำรวม 5 ครั้ง (ก่อนการพ่นสารทดลอง 1 ครั้ง และหลังการพ่นสารทดลอง 4 ครั้ง) ตามตารางที่ 3 พบว่า ก่อนการพ่นสารทดลอง พบจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำในทุกกรรมวิธีระหว่าง 1.0-1.7 ตัวต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 4 ครั้ง พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำมีความแตกต่างกันทางสถิติ คือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารพบหนอนเจาะยอดกะหล่ำระหว่าง 2.3-4.7, 3.3-6.7, 0.0-1.3 และ 0.0-0.7 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1,2,3 และ 4 ตามลำดับ ยกเว้นกรรมวิธีพ่น fipronil และ cypermethrin/phosalone พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำระหว่าง

7.3-7.7,2.3-3.3 และ 1.0-1.3 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 2,3 และ 4 ตามลำดับ และกรรมวิธีพ่น deltamethrin พบหนอนเจาะยอดกะหล่ำ 0.7 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 4 ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีพ่น profenofos และ prothiofos มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำ และไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่น lambda-cyhalothrin, beta-cyfluthrin และ beta-cypermethrin หลังการพ่นครั้งที่ 1-4 สำหรับการตรวจนับจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลาย ตามตารางที่ 4 พบว่าก่อนการพ่นสารทดลองพบว่า จำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายในทุกกรรมวิธีระหว่าง 2.3-3.3 ต้นต่อแปลงย่อย ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติหลังการพ่นสารทดลอง 4 ครั้ง พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายมีความแตกต่างกันทางสถิติหลังการพ่นครั้งที่ 1,3 และ 4 คือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารพบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายระหว่าง 4.3-7.0, 2.0-3.3 และ 0.0-1.7 ต้นต่อแปลงย่อย หลังการพ่นครั้งที่ 1,3 และ 4 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร ซึ่งพบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายระหว่าง 11.3, 7.7 และ 4.3 ต้นต่อแปลงย่อย ยกเว้นกรรมวิธีพ่น fipronil และ cypermethrin/phosalone พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายระหว่าง 8.3-8.7, 7.3-7.7 และ 2.7-3.7 ต้นต่อแปลงย่อย หลังการพ่นครั้งที่ 1,3 และ 4 ตามลำดับ และกรรมวิธีพ่น beta-cyfluthrin, deltamethrin และ deltamethrin (tablet) พบจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลาย 5.3, 5.0 และ 4.3 ต้นต่อแปลงย่อย หลังการพ่นครั้งที่ 3 ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีพ่น profenofos และ lambda-cyhalothrin มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำเข้าทำลายต้นกะหล่ำปลีและไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่น prothiofos, beta-cyfluthrin, beta-cypermethrin , deltamethrin และ deltamethrin (tablet) หลังการพ่นครั้งที่ 1-4

เมื่อพิจารณาผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดที่มีคุณภาพ พบว่าทุกกรรมวิธีที่ใช้สารได้ผลผลิตระหว่าง 5.4-7.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สารที่ได้ผลผลิต 3.9 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ยกเว้นกรรมวิธีพ่น cypermethrin/phosalone และ fipronil ได้ผลผลิต 4.4 และ 4.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ กรรมวิธีพ่น profenofos ได้ผลผลิต 7.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่น prothiofos, lambda-cyhalothein และ beta-cypermethrin ได้ผลผลิต 7.3, 6.9 และ 6.5 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงที่แนะนำบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำในกะหล่ำปลี พบว่าสารฆ่าแมลง beta-cyfluthrin (Folitec 2.5%EC) , beta-cyfluthrin (Chix 5%EC), lambda-cyhalothrin (Karate 2.5%EC) , profenofos (Supercron 50%EC) , prothiofos (Tokuthion 50%EC) มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะยอดกะหล่ำและผลผลิตที่ได้ก็มีคุณภาพน้ำหนักมาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกร นักวิชาการเกษตรและผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงษ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น

ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์ อุราพร ใจเพชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนวารี และสัจจะ ประสงค์

ทรัพย์. 2542 แมลงศัตรูผัก. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพฯ. 97 น.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่าง ๆ ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมิถุนายน – สิงหาคม 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำ (ตัวต่อ 10 ต้น)				
		ก่อนพ่นสาร	หลังการพ่นสาร (ครั้งที่)			
			1	2	3	4
1. beta-cyfluthrin	30	1.7	2.0 a[1/]	4.4 ab	1.3 abc	0.3
2. beta-cypermethrin	30	0.7	2.3 a	4.5 abc	0.7 ab	0.7
3. cypermethrin/phosalone	40	0.7	2.7 a	5.7 bcd	3.0 cd	1.3
4. deltamethrin	30	1.0	2.7 a	6.7 cd	2.7 cd	0.7
5. deltamethrin (tablet)	4	1.3	1.7 a	6.1 cd	2.0 bc	0.0
6. lambda-cyhalothrin	40	0.7	2.3 a	3.5 ab	0.7 ab	0.3
7. fipronil	40	0.7	3.0 a	7.1 d	4.0 d	0.7
8. profenofos	40	1.0	1.3 a	3.2 a	0.0 a	0.0
9. prothiofos	40	0.7	2.0 a	3.7 ab	0.0 a	0.0
10. control	-	1.0	6.7 b	7.2 d	3.7 d	1.7
CV(%)		105.9	59.8	22.2	53.3	163.8
RE(%)		-	-	142.9	70.7	67.8

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนต้นกะหล่ำที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายและผลผลิตกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่างๆ ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนมิถุนายน – สิงหาคม 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกทำลาย (ต้นต่อแปลงย่อย)					ผลผลิตกะหล่ำปลี (กิโลกรัมต่อตารางเมตร)
		ก่อนพ่นสาร	หลังการพ่นสาร (ครั้งที่)				
			1	2	3	4	
1. beta-cyfluthrin	30	5.7	7.3	8.3 a[1/]	4.3 abc	3.7 a	4.7 bcd
2. beta-cypermethrin	30	4.3	7.3	8.7 a	4.0 abc	3.7 a	5.0 abc
3. cypermethrin/phosalone	40	4.0	8.0	10.7 a	7.0 cde	4.3 a	4.1 cde
4. deltamethrin	30	5.0	9.7	11.0 a	6.3 b-e	4.0 a	4.1 cde
5. deltamethrin (tablet)	4	5.7	7.0	10.3 a	5.3 a-d	3.3 a	4.6 bcd
6. lambda-cyhalothrin	40	4.7	7.3	7.7 a	4.0 abd	3.7 a	5.2 ab
7. fipronil	40	4.3	8.7	12.3 ab	7.7 de	4.7 a	3.7 de
8. profenofos	40	5.0	6.3	6.7 a	3.3 a	3.0 a	5.7 a
9. prothiofos	40	5.0	7.0	7.7 a	3.7 ab	3.0 a	5.4 ab
10. control	-	4.7	12.3	17.7 b	8.7 e	9.3 b	3.2 e
CV(%)		-	36.9	33.2	30.6	45.7	11.4
RE(%)		-	-	-	82.2	90.4	-

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่าง ๆ ที่ อ .ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนพฤษภาคม – กรกฎาคม 2546

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนเจาะยอดกะหล่ำ (ตัวต่อ 10 ต้น)				
		ก่อนพ่นสาร	หลังการพ่นสาร (ครั้งที่)			
			1	2	3	4
1. beta-cyfluthrin	30	1.3	3.7 a[1/]	5.0 a-d	1.0 a	0.3 ab
2. beta-cypermethrin	30	1.3	3.0 a	4.3 abc	0.7 a	0.7 abc
3. cypermethrin/phosalone	40	1.0	3.3 a	7.3 def	2.3 bc	1.0 abc
4. deltamethrin	30	1.7	3.7 a	6.3 b-e	1.3 ab	0.7 abc
5. deltamethrin (tablet)	4	1.3	3.0 a	6.7 cde	1.3 ab	0.3 ab
6. lambda-cyhalothrin	40	1.0	2.3 a	4.0 ab	0.7 a	0.0 a
7. fipronil	40	1.3	4.7 a	7.7 ef	3.3 c	1.3 bc
8. profenofos	40	1.3	2.7 a	3.3 a	0.0 a	0.0 a
9. prothiofos	40	1.3	3.0 a	3.3 a	0.3 a	0.0 a
10. control	-	1.7	8.3 b	9.7 f	3.0 c	1.7 c
CV(%)		73.4	50.5	22.8	52.2	112.6
RE(%)		-	-	88.9	67.7	66.8

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนต้นกะหล่ำที่ถูกหนอนเจาะยอดกะหล่ำทำลายและผลผลิตกะหล่ำปลีในกรรมวิธีทดสอบต่าง ๆ ที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี ระหว่างเดือนพฤษภาคม – กรกฎาคม 2546

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม/น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นกะหล่ำปลีที่ถูกทำลาย (ต้นต่อแปลงย่อย)					ผลผลิตกะหล่ำปลี (กิโลกรัมต่อตารางเมตร)
		ก่อนพ่นสาร	หลังการพ่นสาร (ครั้งที่)				
			1	2	3	4	
1. beta-cyfluthrin	30	3.3	7.0 ab[1/]	9.0	5.3 ab	1.3 ab	6.1 bcd
2. beta-cypermethrin	30	2.7	5.7 ab	7.0	3.3 a	1.3 ab	6.5 abc
3. cypermethrin/phosalone	40	2.7	8.3 abc	12.3	7.7 b	2.7 bc	4.4 ef
4. deltamethrin	30	3.0	6.3 ab	9.7	5.0 ab	1.7 ab	5.4 de
5. deltamethrin (tablet)	4	2.7	6.3 ab	9.0	4.3 ab	1.3 ab	5.7 cd
6. lambda-cyhalothrin	40	2.3	4.3 a	6.7	2.0 a	0.3 a	6.9 ab
7. fipronil	40	2.3	8.7 bc	12.7	7.3 b	3.7 c	4.4 ef
8. profenofos	40	2.3	4.3 a	5.3	2.0 a	0.0 a	7.4 a
9. prothiofos	40	2.7	5.0 ab	6.7	2.7 a	0.0 a	7.3 a
10. control	-	2.3	11.3 c	15.3	7.7 b	4.3 c	3.9 f
CV(%)		41.3	31.6	16.2	38.6	62.5	10.2
RE(%)		-	-	207.1	-	80.3	-

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์โดยวิธี DMRT.

ประสิทธิภาพ เชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และสารฆ่าแมลง ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม

Efficacy of Bacteria ,Virus and Insecticides for controlling Beet Armyworm, *Spodoptera exiqua (Hubner)*

สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น **อุราพร หนูนารถ**

อัจฉรา ตันติโชดก **ปิยรัตน์ เขียนมีสุข**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และสารฆ่าแมลงที่แนะนำบางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมในกะหล่ำปลีที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี แปลงทดลองที่ 1 ระหว่างเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2545 และแปลงทดลองที่ 2 ระหว่างเดือน กรกฎาคม -กันยายน 2546 วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธีคือ พ่นสารฆ่าแมลง chlorfluazuron , chlorfenapyr , tebufenozide , spinosad , เชื้อไวรัส , เชื้อแบคทีเรีย (Bactospeine HP) , เชื้อแบคทีเรีย (Delfin WG) , เชื้อแบคทีเรีย (Florbac WDG และ เชื้อแบคทีเรีย (Bt2-DOA) อัตรา 40 มล., 40 มล., 40 มล., 30 มล., 30 มล.,80 กรัม, 80 กรัม, 80 กรัม และ 100 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ และกรรมวิธีไม่ใช้สาร แปลงทดลองที่ 1 ทุกกรรมวิธีที่พ่นสารยกเว้น เชื้อแบคทีเรีย (Bt2-DOA) พบหนอนกระทู้หอม 0.0-6.3 ตัว/10 ต้น และได้ผลผลิต 4.2-8.3 กิโลกรัม/ตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สารที่พบหนอนกระทู้หอม 5.0-12.7 ตัว/10 ต้น และได้ผลผลิต 0.1 กิโลกรัม/ตารางเมตร แปลงทดลองที่ 2 ทุกกรรมวิธีที่พ่นสาร พบหนอนกระทู้หอม 0.0-11.3 ตัว/10 ต้น แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สารที่พบหนอนกระทู้หอม 5.3-20.7 ตัว/10 ต้น

ทะเบียนวิจัยที่ 4506006026

คำนำ

พืชผักตระกูลกะหล่ำ (*Crucifers, Brassica* spp) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกประมาณ 343,000 ไร่ เนื่องจากเป็นพืชผักที่ใช้บริโภคในชีวิตประจำวันจึงมีการปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะในเขตจังหวัดรอบ ๆ กรุงเทพฯ พืชผักตระกูลนี้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก ผักกาวขาวปลี คะน้ำ ผักกาดหัว กวางตุ้ง และบร๊อคโคลี่ เป็นต้น (ปิยรัตน์ และคณะ,2542) ปัญหาการผลิตพืชผักตระกูลกะหล่ำที่สำคัญ คือ แมลงศัตรูพืช ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ และด้วงหมัดผัก เป็นต้น

สำหรับหนอนกระทู้หอม (Beet armyworm : *Spodoptera exiqua* (Hubner)) เป็นหนอนผีเสื้อศัตรูสำคัญต่อการปลูกผัก โดยหนอนเมื่อฟักออกจากกลุ่มไข่ในวัยแรกเข้าทำลายพืช โดยกัดกินบริเวณส่วนต่างๆ ของใบพืชในระยะต่อมาจะเริ่มทำลายรุนแรงโดยหนอนเจาะแยกย้ายกัดกินทุกส่วนของพืช ทำความเสียหายให้กับพืช หากป้องกันกำจัดไม่ถูกต้องแล้ว ผลผลิตจะได้รับความเสียหายและคุณภาพพืชผักไม่เป็นที่ต้องการของตลาด หนอนผีเสื้อดัง ชนิดนี้พบทั่วทุกภาคของประเทศไทยและมักพบระบาดทั่วๆ ไปตลอดปี โดยเฉพาะระบาดรุนแรงในช่วงฤดูร้อน ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง เชื้อแบคทีเรีย และเชื้อไวรัส ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมแมลงศัตรูกะหล่ำปลี ก็จะเป็นแนวทางการเลือกใช้สารฆ่าแมลงได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพและที่สำคัญ เชื้อแบคทีเรียและเชื้อไวรัสไม่เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และแมลงศัตรูธรรมชาติ อีกทั้งไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถชะลอ หรือลดการต้านทานต่อสารฆ่าแมลง รวมทั้งลดปัญหาสารพิษตกค้างจากการใช้สารฆ่าแมลงลงได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์กะหล่ำปลี (Speed 047)
2. สารฆ่าแมลง chlofenapyr (Rampage 10%SC) , chlorfluazuron (Atabron 5%EC) spinosad(Success 12%SC), tebufenozide (Mimic 20%F)
3. เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* var kuristaki (Bactospeine HP, Delfin WG, และ *Bacillus thuringiensis* var aizawai (Centari EDG,Florbac WDG, Bt2-DOA)
4. เชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (DOA BIO V1)
5. สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb (Pencozeb 80 % WP)
6. เครื่องพ่นสารแบบโยกสะพายหลัง
7. ปุ๋ยเคมีสูตร 20-20-0,15-15-15
8. ปุ๋ยทางใบ (Sorba-spray CaB)

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี

กรรมวิธีที 1	พ่น chlorfluazuron (Atabron 5%EC)	อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	พ่น chlofenapyr (Rampage 10%SC)	อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	พ่น tebufenozide (Mimic 20%F)	อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	พ่น spinosad (Success 12%SC)	อัตรา 30 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	พ่นเชื้อไวรัส (DOA BIO V1)	อัตรา 40 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Bactospeine HP)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Delfin WG)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Florbac WDG)	อัตรา 80 กรัม / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 9	พ่นเชื้อแบคทีเรีย (Bt2-DOA)	อัตรา 100 มิลลิลิตร / น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 10	ไม่ใช้สารฆ่าแมลง	

การทดลองประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม ดำเนินการทดลองเดือนตุลาคม 2545 -กันยายน 2546 โดยทำการย้ายกล้าโดยทำการย้ายกล้ากะหล่ำปลีอายุ 30 วัน ลงในแปลงทดลองซึ่งมีขนาดแปลงย่อย 1.4X15 เมตร ระยะปลูกระหว่างแถว 40 เซนติเมตร ระหว่างต้น 30 เซยติเมตร และเริ่มพ่นสารทดลองตามกรรมวิธีครั้งแรกเมื่อพบหนอนกระทู้หอมเฉลี่ย 1 ตัวต่อต้น โดยพ่นสารทดลองทุก 5 วัน จำนวน 6 ครั้ง ตรวจนับปริมาณหนอนกระทู้หอมทุกครั้งก่อนการพ่นสารทดลอง โดยสุ่มตรวจนับจากกะหล่ำปลีจำนวน 10 ต้นต่อแปลงย่อย และทำการเปรียบเทียบน้ำหนักผลผลิตที่มีคุณภาพระยะส่งตลาดของกะหล่ำปลี จากการสุ่มกะหล่ำปลีในพื้นที่ 1.0 ตารางเมตร เมื่อกะหล่ำปลีอายุได้ 65 วันหลังย้ายกล้าและนำข้อมูลที่ทำการบันทึกไปวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลอง

แปลงทดลองที่ 1 ตุลาคม-ธันวาคม 2545

จากการตรวจนับจำนวนหนอนกระทู้หอมรวม 7 ครั้ง (ก่อนการพ่นสารทดลอง 1 ครั้ง และ หลังการพ่นสารทดลอง 6 ครั้ง) ตามตารางที่ 1 พบว่า ก่อนพ่นสารทดลอง พบจำนวนหนอนกระทู้หอมในทุกกรรมวิธีระหว่าง 5.7-29.0 ตัวต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 6 ครั้ง พบหนอนกระทู้หอมมีความแตกต่างกันทางสถิติทุกครั้งคือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารพบหนอนกระทู้หอมระหว่าง 0.0-5.3, 0.0-6.3, 0.0-6.0,0.0-6.3,0.0-3.7 และ 0.0-2.0 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1-6 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร ซึ่งพบหนอนกระทู้หอม 11.0,12.7,12.3,9.0,7.0 และ 5.0 ตัวต่อ 10 ต้น ตามลำดับ ยกเว้นกรรมวิธีพ่น NPV และ Florbac WDG พบหนอนกระทู้หอมระหว่าง 7.7 และ 6.0 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 1 ตามลำดับ และกรรมวิธีพ่น Bactospeine HP พบหนอนกระทู้หอม 8.3, 8.7

และ 6.7 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 1,3 และ 4 ตามลำดับ และกรรมวิธีพ่น DOA.Bt2 พบหนอนกระทู้หอม 9.7,11.3,13.0,10.0, 5.7 และ 4.9 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1-6 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีพ่น chlorfenapyr, tebufenozide, spinosad และ chlorfluazuron แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมตลอดการทดลอง

เมื่อพิจารณาผลผลิตกะหล่ำปลีระยะส่งตลาดก็ให้ผลสอดคล้องกับปริมาณหนอนกระทู้หอมที่ลงทำลายกะหล่ำปลี กล่าวคือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารได้ผลผลิตระหว่าง 4.2-8.3 กิโลกรัมต่อตารางเมตร แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สารที่ได้ผลผลิต 0.1 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ยกเว้นกรรมวิธีพ่น DOA.Bt2 ได้ผลผลิต 0.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดคือ กรรมวิธีพ่น chlorfenapyr, tebufenozide, spinosad และ chlorfluazuron ได้ผลผลิต 8.3, 8.0, 8.1 และ 7.4 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

4.2 แปลงทดลองที่ 2 กรกฎาคม-กันยายน 2546

จากการทดลองหลังการพ่นสารทดลอง 3 ครั้ง เกิดการเข้าทำลายของโรคเน่าเละ (soft rot) อย่างรุนแรง เนื่องจากสภาพอากาศร้อนสลับฝนเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้เกิดการระบาดของเชื้อแบคทีเรีย (*Erwinia* sp) อย่างรวดเร็ว และจากการตรวจนับจำนวนหนอนกระทู้หอมรวม 4 ครั้ง (ก่อนการทดลอง 1 ครั้ง และหลังการทดลอง 3 ครั้ง) ตามตารางที่ 2 พบว่า ก่อนพ่นสารทดลอง พบจำนวนหนอนกระทู้หอมในทุกกรรมวิธีระหว่าง 12.0-21.7 ตัวต่อ 10 ต้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หลังการพ่นสารทดลอง 3 ครั้ง พบหนอนกระทู้หอมมีความแตกต่างกันทางสถิติทุกครั้งคือ ทุกกรรมวิธีที่ใช้สารพบหนอนกระทู้หอมระหว่าง 0.7-11.3,0.0-7.0 และ 0.7-3.7 ตัวต่อ 10 ต้น (หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1-3 ตามลำดับ แตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร ซึ่งพบหนอนกระทู้หอม 20.7,12.3 และ 5.3 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นสารทดลองครั้งที่ 1-3 ตามลำดับ) ยกเว้นกรรมวิธีพ่น Bactospeine HP และ DOA.Bt2 พบหนอนกระทู้หอมระหว่าง 15.0 และ 16.7 ตัวต่อ 10 ต้น หลังการพ่นครั้งที่ 1 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการไม่ใช้สาร โดยกรรมวิธีพ่น chlorfenapyr, tebufenozide และ spinosad แสดงประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมตลอดการทดลอง

สำหรับผลผลิตกะหล่ำปลีไม่สามารถดำเนินการเก็บข้อมูลได้ เนื่องจากเกิดการเข้าทำลายของโรคเน่าเละ (soft rot) อย่างรุนแรง เนื่องจากสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงเหมาะสมต่อการระบาดของเชื้อแบคทีเรีย (*Erwinia* sp) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่าเละ

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงที่แนะนำ บางชนิดในการป้องกันกำจัดหนอนใยผักในกะหล่ำปลีพบว่า สารฆ่าแมลง chlorfluazuron , chlorfenapyr , tebufenozide , spinosad , เชื้อไวรัส และเชื้อ

แบคทีเรีย (Florbac WDG)มีประสิทธิภาพที่ดีในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม และผลผลิตที่ได้ก็มีคุณภาพน้ำหนักมาก

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกร นักวิชาการเกษตรและผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้ผลงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงษ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น

ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์ อุราพร ใจเพชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนวารี และสัจจะ ประสงค์

ทรัพย์. 2542 แมลงศัตรูผัก. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพฯ. 97 น.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวนหนอนกระทู้หอมที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีและผลผลิตในกรรมวิธีทดสอบต่างๆที่ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือน ตุลาคม-ธันวาคม 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม / น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนกระทู้หอม (ตัว / 10 ต้น)							ผลผลิตกะหล่ำปลี (กิโลกรัมต่อตารางเมตร)
		ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นสาร (ครั้งที่)						
			1	2	3	4	5	6	
chlorfluazuron	40	5.7	4.3 a-d	4.3 ab	2.0 ab	3.3 ab	1.3 ab	0.0 a	7.4 b
chlorfenapyr	40	6.7	0.0 a	0.0 a	0.3 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	8.3 a
tebufenozide	40	9.0	2.3 ab	1.3 a	0.0 a	1.0 a	0.0 a	0.0 a	8.0 ab
spinosad	30	29.0	3.3 abc	2.3 ab	0.0 a	1.0 a	0.0 a	0.0 a	8.1 ab
DOA BIO V1	30	7.3	7.7 b-e	6.3 b	5.3 bc	6.3 bc	3.7 bc	2.0 a	5.1 c
Bactospeine	80	5.7	8.3 cde	6.0 b	8.7 cd	6.7 bcd	3.3 bc	1.0 a	4.2 d
Delfin WG	80	5.3	5.3 bcd	2.7 ab	5.3 bc	5.3 b	1.7 ab	1.7 a	5.3 c
Florbac WDG	80	11.3	6.0 b-e	3.3 abc	6.0 bc	4.3 b	2.3 ab	1.7 a	5.2 c
DOA Bt.2	100	6.0	9.7 de	11.3 c	13.0 d	10.0 d	5.7 cd	4.9 b	0.4 e
Control	-	6.7	11.0 e	12.7 c	12.3 d	9.0 cd	7.0 d	5.0 b	0.1 e
CV(%)		147.3	48.2	45.2	37.7	40.6	68.2	72.5	8.0
RE(%)				80.9	94.3	56.4	62.7	93.0	

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT.

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนหนอนกระทู้หอมที่ตรวจพบบนกะหล่ำปลีและผลผลิตในกรรมวิธีทดสอบต่างๆที่ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือน กรกฎาคม-กันยายน 2546

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตรหรือกรัม / น้ำ 20 ลิตร)	ค่าเฉลี่ยจำนวนหนอนกระทู้หอม (ตัว / 10 ต้น)							ผลผลิตกะหล่ำปลี (กิโลกรัมต่อตารางเมตร)
		ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นสาร (ครั้งที่)						
			1	2	3	4	5	6	
chlorfluazuron	40	12.0	10.0 bcd[1/]	3.3 bc	0.0 a	-	-	-	-
chlorfenapyr	40	15.3	0.7 a	0.0 a	0.0 a	-	-	-	-
tebufenozide	40	17.0	7.7 abc	0.3 a	0.0 a	-	-	-	-
spinosad	30	20.7	4.7 ab	0.7ab	0.0 a	-	-	-	-
DOA BIO V1	30	19.3	11.3 bcd	2.7ab	0.3 a	-	-	-	-
Bactospeine	80	14.7	15.0 cde	5.0 cd	2.3 bc	-	-	-	-
Delfin WG	80	13.3	10.3 bcd	1.3 ab	1.0 ab	-	-	-	-
Florbac WDG	80	21.7	10.7 bcd	2.3 ab	0.7 a	-	-	-	-
DOA Bt.2	100	15.7	16.7 de	7.0d	3.7 c	-	-	-	-
Control	-	17.7	20.7 e	12.3e	5.3 d	-	-	-	-
CV(%)		16.7	36.4	12.3	62.9	-	-	-	-
RE(%)				70.3	44.6	-	-	-	-

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT.

ศึกษาประสิทธิภาพและระยะเวลาที่เหมาะสมในการพ่นสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้าและผลต่อศัตรูธรรมชาติ

Efficacy Test and Appropiate Timing of Chemical Insecticides for Controlling Flea Beetle on Chinese Kale and Their Effects on Natural Enemies

วิภาดา ปลอดครบุรี มาลี ชวนะพงศ์ วัชรา ชุณหวงศ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง4 ชนิด ป้องกันกำจัดด้วงหมักผักในคะน้า (การทดลองที่ 1) ในสวนผักเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในแปลงย่อย ขนาด 1.3x12 เมตร ระยะระหว่างแปลงย่อย 0.25 เมตร แปลงทดลองที่ 1 ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน 2545 แปลงทดลองที่ 2 ระหว่างเดือนกรกฎาคม – กันยายน 2545 วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 8 กรรมวิธี คือ สารฆ่าแมลง profenofos, prothiofos, carbosalfan 3 อัตรา และ fipronil 2 อัตรา ใช้ในอัตรา40, 40, 60, 70, 80, 30 และ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพ่นสารทุก 4 วัน จำนวน 4 ครั้ง โดยใช้เครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง ในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ ทำการสุ่มตรวจนับจำนวนต้นที่ถูกทำลายที่ใบยอด และศัตรูธรรมชาติจากคะน้า 20 ต้น/แปลงย่อย ก่อนพ่นสารทุกครั้งและหลังพ่นสารครั้งสุดท้าย 4 วัน

แปลงทดลองที่ 1 พบว่า สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก คือ fipronil (Ascend 5% W/VSC) อัตรา 30 และ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร หลังพ่นสารครั้งที่ 2-4 มีเปอร์เซ็นต์ต้นคะน้าที่ใบยอดถูกด้วงหมัดผักทำลายน้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลง โดยพบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายระหว่าง 51.67-55.00 และ 21.67-40.00 % ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพบ 83.33-100.00 % แปลงทดลองที่ 2 สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก คือ สาร fipronil อัตรา 30 และ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร หลังพ่นสารครั้งที่ 1-4 พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลาย 13.33-33.33 และ 3.33-23.33 % ตามลำดับ และกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพบระหว่าง 78.33-100.00 % รองลงมา คือ profenofos อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร โดยหลังพ่นสารครั้งที่ 2-4 พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายระหว่าง 41.67-

---

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06005 002

53.33 % ส่วนกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพบระหว่าง 76.67-86.67 % ขณะทำการทดสอบ สำรวจไม่พบศัตรูธรรมชาติของด้วงหมัดผัก แต่พบแตนเบียนหนอน *Cotesia* sp. ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติทำลายหนอนใยผักและหนอนกระทู้หอม โดยพบในปริมาณค่อนข้างต่ำ จากผลการทดลองทั้งสองแปลงทดลอง ได้นำสาร fipronil อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร และ profenofos อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร มาศึกษาระยะพ่นที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในระหว่างเดือนมีนาคม-เมษายน 2546 แต่เนื่องจากด้วงหมัดผักมีการระบาดในระดับต่ำมาก จึงไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้

คำนำ

คะน้า (*Brassica olearacea* var. *alboglabra* Bailey) เป็นพืชผักตระกูลกะหล่ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศ ปลูกได้ต่อเนื่องตลอดทั้งปีทั่วทุกภาคของประเทศ มีพื้นที่เพาะปลูกปี 2541/42 ประมาณ 128,749 ไร่ พื้นที่เก็บเกี่ยว 125,525 ไร่ ผลผลิตรวม 335,905 ตัน และผลผลิตเฉลี่ย 2,676 กิโลกรัม/ไร่ (ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร, 2542)

ในการปลูกคะน้ามักประสบกับปัญหาจากแมลงศัตรูพืชเสมอ ด้วงหมัดผัก (Flea beetle : *Phyllotreta sinuata* Steph.) เป็นศัตรูสำคัญชนิดหนึ่งของคะน้า ตั้งแต่งอกจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักชอบกัดกินหรือชอนไชเข้าไปกินอยู่บริเวณโคนต้นหรือรากของผัก ทำให้พืชผักเหี่ยวเฉาและไม่เจริญเติบโต ถ้ารากถูกทำลายมากๆ ก็อาจทำให้พืชผักตายได้ ส่วนตัวเต็มวัยชอบกัดกินผิวด้านล่างของใบ ทำให้ใบมีรูพรุน ด้วงหมัดผักชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ตัวเต็มวัยเมื่อถูกกระทบกระเทือนชอบกระโดดและสามารถบินได้ (ปิยรัตน์ และคณะ , 2542) เกษตรกรจึงจำเป็นต้องใช้สารฆ่าแมลงในอัตราสูงและบ่อยครั้งตลอดฤดูปลูกในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก ทำให้แมลงศัตรูดังกล่าวสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงอย่างรวดเร็ว ผลผลิตที่ได้มักพบสารพิษตกค้างในระดับที่ไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค (วินัย, 2535 ; มาลี และคณะ, 2542) ดังนั้น การศึกษาการทดสอบประสิทธิภาพและระยะเวลาที่เหมาะสมในการพ่นสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก จึงเป็นแนวทางหนึ่ง เพื่อช่วยลดปัญหาดังกล่าว และยังเป็นแนวทางในการแนะนำเกษตรกรผู้ปลูกต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงผักคะน้าทดลอง
2. เมล็ดพันธุ์คะน้า
3. สารฆ่าแมลง : profenofos (Supercron 50% W/V EC), prothiofos (Tokuthion 50% W/V EC), carbosulfan (Posse 20% W/V EC) และ fipronil (Ascend 5% W/V SC)

4. เครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง
5. ปุ๋ยเคมีสูตร 26-14-0 และ 46-0-0
6. ฉากผ้าฝ้ายขนาด 2 x 4 เมตร สำหรับป้องกันการฟุ้งกระจายของละอองสาร

วิธีการ

การทดลองที่ 1 : ศึกษาประสิทธิภาพ สารฆ่าแมลงในการป้อง กันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้าและผลต่อศัตรูธรรมชาติ

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 3 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้ (2 แปลงทดลอง)

1. profenofos อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
2. prothiofos อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
3. carbosulfan อัตรา 60 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
4. carbosulfan อัตรา 70 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
5. carbosulfan อัตรา 80 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
6. fipronil อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
7. fipronil อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร
8. ไม่พ่นสารฆ่าแมลง (Control)

การทดลองที่ 2 : ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการพ่นสารฆ่าแมลง ที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า

วางแผนการทดลองแบบRCB จัดสิ่งทดลองแบบ factorial มี 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี ประกอบด้วย2 ปัจจัย (3x3) และ 1 สิ่งทดลองอื่น คือ

ปัจจัยที่ 1 : สารทดลอง 2 ชนิด ซึ่งให้ผลดีในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักจากการทดลองที่ 1 คือ fipronil (Ascend 5% W/V SC) อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร และ profenofos (Supercron 50% W/V EC) อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร

ปัจจัยที่ 2 : ระยะเวลาที่เหมาะสมในการพ่นสารทดลอง(ปัจจัยที่ 1) 3 ระยะ คือ พ่นสารฆ่าแมลงทุก 3, 5 และ 7 วัน

สิ่งทดลองอื่น : ไม่พ่นสารฆ่าแมลง และน้ำเปล่า

ปลูกคะน้าโดยหว่านเมล็ดพันธุ์คะน้า ในสวนผักแบบยกร่องเตี้ยของเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในแปลงย่อย ขนาด 1.3 x 12 เมตร ระยะระหว่างแปลงย่อย 0.25 เมตร ถอนแยกเมื่อคะน้าอายุประมาณ 20-25 วันหลังงอก ให้มีระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 15-20 เซนติเมตร เริ่มพ่นสารฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบ เมื่อคะน้าอายุประมาณ 30-35 วันหลังงอก หรือเมื่อพบแมลงระบาดหลังถอนแยก ทำการพ่นสารทุก 4 วัน รวม 4 ครั้ง โดยใช้น้ำอัตรา 80 ลิตร/ไร่ ขณะพ่นสารทดสอบ ใช้ฉากผ้าฝ้ายขนาด2 x 4 เมตร จำนวน 2 ฉาก วางใต้ทางลมเพื่อป้องกันการฟุ้งกระจายของละอองสาร

บันทึกข้อมูลโดยสุ่มตรวจนับจำนวนต้นที่พบรอยกัดทำลายจากด้วงหมัดผักบนใบยอด รวมทั้งชนิดและจำนวนศัตรูธรรมชาติ ก่อนพ่นสารทดลองทุกครั้งและหลังพ่นสารครั้งสุดท้าย 4 วัน (การทดลองที่ 1)

ก่อนพ่นสารทดลองทุกครั้ง และหลังพ่นสารครั้งสุดท้าย 3, 5 และ 7 วัน (การทดลองที่ 2) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี Analysis of Covariance โดยให้ข้อมูลก่อนพ่นสารเป็นตัวแปรอิสระ (X) ข้อมูลหลังพ่นสารเป็นตัวแปรตาม (Y) ถ้า Relative Efficiency (R.E.) มีค่าต่ำกว่า 100% ทำการวิเคราะห์ข้อมูลหลังพ่นสาร (Y) โดยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายหลังพ่นสาร ด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เวลาและสถานที่

การทดลองที่ 1 ทำ 2 แปลงทดลอง ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนเมษายน 2545 และเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนกันยายน 2545 ในสวนผักแบบยกร่องเตี้ยของเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

การทดลองที่ 2 ทำการศึกษาระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนเมษายน 2546 ในสวนผักแบบยกร่องเตี้ยของเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้าและผลต่อศัตรูธรรมชาติ

แปลงทดลองที่ 1 เดือนกุมภาพันธ์ ถึงเดือนเมษายน 2545 (ตารางที่ 1)

พบว่า ก่อนพ่นสารทดลอง มีเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลาย ระหว่าง 95.00-100.00 % ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทุกกรรมวิธี หลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 1 เปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายในทุกกรรมวิธีระหว่าง 80.00-91.67 % ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกัน ส่วนหลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 2-4 พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายในกรรมวิธีพ่นสาร fipronil อัตรา 30 และ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร น้อยกว่าและแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลง โดยพบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายระหว่าง 51.67-55.00 และ 21.67-40.00 % ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพบ 83.33-100.00 %

แปลงทดลองที่ 2 เดือนกรกฎาคม ถึงเดือนกันยายน 2545 (ตารางที่ 2)

ก่อนพ่นสารทดลอง พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลาย 100.00 % ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทุกกรรมวิธี หลังพ่นสารครั้งที่ 1-4 เปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายในกรรมวิธีพ่นสาร fipronil อัตรา 30 และ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร น้อยกว่าและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลง โดยพบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลาย 13.33-33.33 และ 3.33-23.33 % ตามลำดับ และกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพบระหว่าง 78.33-100.00 % ส่วนหลังพ่นสารทดลองครั้งที่ 2-4 ในกรรมวิธีพ่นสาร profenofos อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร พบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายน้อยกว่าและแตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลง โดยพบระหว่าง 41.67-53.33 % ส่วนกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลงพบระหว่าง 76.67-86.67 %

ทุกการทดลอง สำรวจไม่พบศัตรูธรรมชาติของด้วงหมัดผัก แต่พบแตนเบียนหนอน *Cotesia* sp. ซึ่งศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักและหนอนกระทู้หอม โดยพบในปริมาณต่ำ

การทดลองที่ 2 : ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการพ่นสารฆ่าแมลง ที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า

ทำการศึกษาระหว่างเดือนมีนาคม ถึงเดือนเมษายน 2546 ในสวนผักแบบยกร่องเตี้ยของเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี จากการสุ่มตรวจนับจำนวนต้นคะน้าที่ใบยอดถูกทำลาย จากคะน้า 20 ต้น/แปลงย่อย พบว่า ก่อนพ่นสารทดลองพบเปอร์เซ็นต์ต้นที่ใบยอดถูกทำลายถึงระดับที่เริ่มพ่นสารทดลองได้ แต่หลังจากการพ่นสารทดลองครั้งที่ 2 พบด้วงหมัดผักและต้นที่ใบยอดถูกทำลายต่ำมากจนถึงกับไม่พบ ทั้งในแปลงใช้สารฆ่าแมลงและแปลงไม่ใช้สารฆ่าแมลง ทำให้ไม่สามารถดำเนินการทดลองต่อไปได้ จึงไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้ การที่พบด้วงหมัดผักต่ำมากในทุกกรรมวิธี อาจเนื่องจากขณะทำการทดลองมีแปลงคะน้าทดลอง อยู่ในพื้นที่ที่มีการปลูกผักกาดเขียวล้อมรอบ ซึ่งลักษณะใบของผักกาดเขียว บางและอ่อนกว่าคะน้า และลักษณะของใบคล้ายกวางตุ้ง ซึ่งเป็นอาหารที่ด้วงหมัดผักชอบระบาดทำลาย และด้วงหมัดผักสามารถบินย้ายไประบาดในแปลงผักข้างเคียงได้อีกด้วย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลง 4 ชนิด ในการป้อง กันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า พบว่า สารฆ่าแมลง fipronil อัตรา 30 และ 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก รองลงมา คือ สารฆ่าแมลง profenofos อัตรา 40 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร และสาร profenofos มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในแปลงทดลองที่2 เท่านั้น แสดงว่าสารนี้เริ่มมีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงไม่พ่นสารฆ่าแมลง ดังนั้น จำเป็นต้องพิจารณาหากจะนำไปใช้ในคำแนะนำการใช้สารฆ่าแมลงต่อไป ใน การทดลองสำรวจไม่พบศัตรูธรรมชาติของด้วงหมัดผัก แต่พบแตนเบียนหนอน *Cotesia* sp. ซึ่งศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักและหนอนกระทู้หอม โดยพบในปริมาณต่ำ

การศึกษาระยะพ่นสารฆ่าแมลงที่เหมาะสม ไม่สามารถสรุปผลการทดลองได้

เอกสารอ้างอิง

ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร. 2542. สถิติการเพาะปลูกพืชผักปี 2541/42. กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 2 หน้า.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงศ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ อุราพร ใจเพ็ชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนวารี และสัจจะ ประสงค์ทรัพย์ 2542. แมลงศัตรูผัก. เอกสารวิชาการแมลงศัตรูผัก. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 97 หน้า.

มาลี ชวนะพงศ์ จีรนุช เอกอำนวย ดำรง เวชกิจ รจนา สุรการ และสุปราณี อิ่มพิทักษ์ . 2542. เทคนิคการพ่นสารกำจัดหนอนใยผัก *Plutella xylostella* (Linnaeus) ในคะน้า. ว. กีฏ. สัตว. 21(4): 243-251.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2535. แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำและแนวทางการบริหาร. หน้า 142-145. *ใน* แมลงและสัตว์ศัตรูพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

ตารางที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ต้นคะน้าที่ใบยอดถูกด้วงหมัดผักทำลาย ที่แปลงเกษตรกรอำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร)	ต้นคะน้าที่ใบยอดถูกด้วงหมัดผักทำลาย (%)				
		ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นสาร (ครั้งที่)			
			1	2	3	4
profenofos	40	100.00	80.00	91.67 cde [1/]	90.00 b	100.00 c
prothiofos	40	98.33	83.33	88.33 cde	80.00 b	93.33 c
carbosunfan	60	95.00	91.67	96.67 e	86.67 b	96.67 c
carbosunfan	70	98.33	91.67	81.67 c	88.33 b	96.67 c
carbosunfan	80	100.00	88.33	85.00 cd	98.33 b	98.33 c
fipronil	30	98.33	80.00	53.33 b	51.67 a	55.00 b
fipronil	40	96.67	80.00	40.00 a	31.67 a	21.67 a
ไม่ใช้สารฆ่าแมลง	-	98.33	91.67	93.33 de	88.33 c	100.00 c
เฉลี่ย		98.12	85.83	78.75	76.88	82.71
CV (%)		3.9	8.8	7.5	16.4	4.6
RE (%)		-	133.1	108.5	29.1	54.4

1/ ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในคะน้า โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ต้นคะน้าที่ใบยอดถูกด้วงหมัดผักทำลาย ที่แปลงเกษตรกรอำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ในระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน 2545

กรรมวิธี	อัตรา (มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร)	ต้นคะน้าที่ใบยอดถูกด้วงหมัดผักทำลาย (%)				
		ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นสาร (ครั้งที่)			
			1	2	3	4
profenofos	40	100.00	60.00 bc	51.67 b [1/]	41.67 a	53.33 c
prothiofos	40	100.00	75.00 cd	76.67 bc	66.67 ab	75.00 bc
carbosunfan	60	100.00	71.67 cd	60.00 bc	73.33 b	58.33 bc
carbosunfan	70	100.00	91.67 d	63.33 bc	65.00 b	73.33 bc
carbosunfan	80	100.00	63.33 bc	61.67 bc	68.33 b	61.67 bc
fipronil	30	100.00	33.33 a	23.33 a	26.67 a	13.33 a
fipronil	40	100.00	46.67 ab	18.33 a	23.33 a	3.33 a
ไม่ใช้สารฆ่าแมลง	-	100.00	78.33 cd	85.00 c	86.67 c	76.67 c
เฉลี่ย		100.00	65.00	55.00	56.46	51.87
CV (%)		0	19.0	27.6	15.7	22.3
RE (%)		-	111.1	65.9	114.7	50.6

[1/] ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธี DMRT

ศึกษาประสิทธิภาพการพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า

Efficacious Study on Various Sprayer with Nematode (*Steinernema carpocapsae*) for Controlling Chinese Kale Insect Pests

จีรนุช เอกอำนวย ดำรง เวชกิจ
ไพศาล รัตนเสถียร
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาประสิทธิภาพการพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลง ด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า ในปี 2545 - 2546 ทำการทดลอง 2 ครั้ง ที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม - พฤษภาคม 2545 และมีนาคม - เมษายน 2546 วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 ซ้ำ มี 6 กรรมวิธี ดังนี้ พ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* อัตรา 4,000 ตัว/มิลลิลิตร แบบน้ำมากด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง เครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม และพ่นแบบน้ำน้อย ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม โดยมี กรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin (Vertimec 1.8% EC) อัตราสารออกฤทธิ์ 3.60-4.32 กรัม/ไร่ (อัตราแนะนำ) ในการทดลองที่ 1 และอัตรา 2.70-3.24 กรัม/ไร่ (3/4 ของอัตราแนะนำ) ในการทดลองที่ 2 แบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม และ กรรมวิธี ไม่พ่นสาร ทำการพ่นสารทุก 3 วัน ผลการทดลองทั้ง 2 ครั้ง ให้ผลไปในทำนองเดียวกัน คือการพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงทั้งแบบน้ำมากและน้ำน้อยด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ ให้ผลในการควบคุมแมลงศัตรู คะน้า ที่สำคัญ เช่น หนอนใยผัก และให้ผลผลิตไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่พ่นสาร แต่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อยด้วยเครื่องพ่นสารแบบใช้แรงลม โดยสรุปคือถ้าแมลงศัตรูคะน้าโดยเฉพาะหนอนใยผัก ระบาดเกินกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ การพ่น ไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงทั้งแบบน้ำมากและน้ำน้อยไม่สามารถควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูคะน้าได้

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06002 015

คำนำ

ปัจจุบันการปลูกพืชหลายชนิดประสบปัญหาแมลงศัตรูระบาดรุนแรง เช่น พืชผัก ทั้งนี้แมลงเกิดการต้านทานหรือดื้อต่อสารฆ่าแมลงมากขึ้น เนื่องจากเกษตรกรมักปลูกผักติดต่อกันในพื้นที่เดิมตลอดเวลา บางแห่งนานนับสิบปี ทำให้เกิดการสะสมของศัตรูพืชรวมทั้งความสมดุลย์ทางธรรมชาติที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยหรือสิ่งมีชีวิตที่คอยควบคุมระดับประชากรแมลงศัตรูให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจนั้นมีน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพในพืชอื่น เช่น ไม้ผล เป็นผลให้เกษตรกรเพิ่มปริมาณการใช้สาร มีการใช้สารเคมีหลายชนิดในเวลาเดียวกัน มีการพ่นสารบ่อยครั้ง เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม และก่อให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในผลผลิต ซึ่งมีผลกระทบต่อการค้า การส่งออก ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะศึกษาทางเลือกใหม่ หรือหาสารทดแทนสารเคมี เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในผลผลิต ไส้เดือนฝอย (***Steinernema carpocapsae***) เป็นชีวินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ในสภาพไร่ ยังมีข้อ จำกัดอยู่หลายประการ และจากการ ศึกษาวิธีการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช พบว่าวิธีการพ่นสารแบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลมสามารถควบคุมแมลงศัตรูคะน้าได้ดี (จีรนุช และคณะ, 2542; จีรนุช และคณะ, 2544) จึงได้ทำการทดลองศึกษาประสิทธิภาพวิธีการพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลง ทั้งแบบน้ำมากและน้ำน้อยด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงคะน้า
2. เครื่องยนต์พ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง (SOLO)
3. เครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง (Mitsubishi)
4. เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม (SOLO 423)
5. หัวฉีดแบบกรวยกลวง ขนาด 0.8 และ 1.6 มิลลิเมตร หัวฉีดแบบฝักบัว และหัวฉีด Wizza ขนาด 3/64 และ 1/16 นิ้ว
6. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ***Steinernema carpocapsae*** และสารจับใบ
7. สารฆ่าแมลง abamectin (Vertimec 1.8% EC) และ fipronil (Ascend 5% SC)
8. สารป้องกันกำจัด โรคพืช metalaxyl+mancozeb (Ridomil MZ 72 WP)
9. สารกำจัดวัชพืช glyphosate (Round up 48% SL)
10. สารจับใบ
11. ปุ๋ยคอก และปุ๋ยวิทยาศาสตร์ สูตร15-15-15

12. เครื่องวัดอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วลม

13. ตาชั่ง

วิธีการ

การทดลองที่ 1

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ ทำการพ่นสารตามกรรมวิธี ดังนี้

1. พ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบน้ำมากด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลังประกอบหัวฉีดแบบกรวยกลวงขนาด 0.8 และ 1.6 มิลลิเมตร อัตราพ่น 100-120 ลิตร/ไร่

2. พ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบน้ำมากด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูงประกอบหัวฉีดแบบกรวยกลวงขนาด 0.8 และ 1.6 มิลลิเมตร อัตราพ่น 100-120 ลิตร/ไร่

3. พ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบน้ำมากด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลมประกอบหัวฉีด แบบฝักบัว อัตราพ่น 100-120 ลิตร/ไร่

4. พ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลมประกอบหัวฉีด Wizza ขนาด 3/64 และ 1/16 นิ้ว อัตราพ่น 15-20 ลิตร/ไร่

5. พ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลมประกอบหัวฉีด Wizza ขนาด 3/64 และ 1/16 นิ้ว ใช้อัตราสารออกฤทธิ์ 3.60-4.32 กรัม/ไร่ (อัตราแนะนำ) อัตราพ่น 15-20 ลิตร/ไร่

6. ไม่พ่นสาร

กรรมวิธี 1-3 พ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ใช้อัตรา 4,000 ตัว/น้ำ 1 มิลลิลิตร โดยกรรมวิธีที่ 4ใช้อัตราไส้เดือนฝอยเท่ากับอัตราการพ่นแบบน้ำมากแต่ลดปริมาณน้ำที่ผสม ทำการพ่นสารทุก 3 วัน ทุกกรรมวิธีใช้ความกว้างแนวพ่นสาร 1.20 เมตร ยกเว้น กรรมวิธีที่ 1 ใช้ความกว้างแนวพ่นสาร 0.60 เมตร

การทดลองที่ 2

วางแผนการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ยกเว้นกรรมวิธีที่ 5 ใช้สารฆ่าแมลง abamectin ในอัตราสารออกฤทธิ์ 2.70-3.24 กรัม/ไร่ (3/4 ของอัตราแนะนำ)

ทั้ง 2 การทดลองทำการปฏิบัติการทดลองดังนี้

หว่านเมล็ดพันธุ์บนแปลงทดลอง ขนาดแปลงย่อย 2.40 x 10.00 เมตร เว้นระยะระหว่างแปลงย่อย 1.20 เมตร ใส่ปุ๋ยคอก อัตรา 800 กก./ไร่ เมื่อคะน้ามีอายุ 3 สัปดาห์ ทำการถอนแยกใส่ปุ๋ยวิทยาศาสตร์ สูตร 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ ทำการให้น้ำโดยใช้ springkler ขนาดเล็กทุกวัน ยกเว้นวันที่ทำการพ่นสาร กำจัดวัชพืชด้วยสาร glyphosate อัตรา 160 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร อัตรา 80 ลิตร/ไร่ และการเขตกรรมอื่น ๆ โดยใช้แรงคน และปลูกข้าวฟ่างกั้นระหว่างแปลงย่อยป้องกันการฟุ้งกระจายของสาร

พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืช metalaxyl + mancozeb อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร พ่นในอัตรา 80 ลิตร/ไร่ ทุก 7 วัน

พ่นสารฆ่าแมลง fipronil เพื่อกำจัดด้วงหมัดผักในระยะที่ผักคะน้ายังเล็กอยู่ อัตรา 30 มิลลิลิตร/น้ำ 20 ลิตร พ่นในอัตรา 80 ลิตร/ไร่

เมื่อมีการระบาดของแมลงศัตรูคะน้า ทำการพ่นสารตามแผนการทดลอง เมื่อคะน้าอายุได้ 35 วัน (การทดลองที่ 1) และ 26 วัน (การทดลองที่ 2) หลังงอก โดยก่อนพ่นทำการตรวจวัดอัตราการไหลของหัวฉีดที่ใช้กับเครื่องพ่นสารแต่ละแบบ เพื่อคำนวณหาความเร็วของการเดินพ่นสาร เพื่อให้ได้อัตราการพ่นและอัตราไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและสารฆ่าแมลงตรงตามแผนงานที่วางไว้ ตามรายละเอียด ดังนี้

1. การพ่นด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง ยี่ห้อ SOLO ใช้หัวฉีด ขนาด 0.8 และ 1.6 มิลลิเมตร ให้อัตราการไหล ประมาณ 600 และ950 มิลลิลิตร/นาที เดินพ่นด้วยความเร็ว ประมาณ 16 และ 21 เมตร/นาที

2. การพ่นด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง ยี่ห้อ Mitsubishi ปรับคันเร่งเบอร์ 2 หัวฉีดให้อัตราการไหล ประมาณ 2,200 – 2,500 มิลลิลิตร/นาที เดินพ่นด้วยความเร็ว ประมาณ 28-29 เมตร/นาที

3. การพ่นด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลัง แบบใช้แรงลม ยี่ห้อ SOLO 423 ใช้หัวฉีดฝักบัว ปรับรูบังคับน้ำยา เบอร์ 3 และ 4 หัวฉีดให้อัตราการไหล 2,300 – 2,900 มิลลิลิตร/นาที เดินพ่นด้วยความเร็ว ประมาณ 30 – 32 เมตร/นาที

4. การพ่นด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลมใช้หัวฉีด Wizza ขนาด 3/64 และ 1/16 นิ้ว การพ่นเชื้อไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลง หัวฉีดให้อัตราการไหล 400 และ 630 มิลลิลิตร/นาที เดินพ่นด้วยความเร็ว ประมาณ 35 – 42 เมตร/นาที การพ่นสาร abamectin หัวฉีดให้อัตราการไหล 300 และ 600 มิลลิลิตร/นาที เดินพ่นด้วยความเร็ว ประมาณ 26 – 40 เมตร/นาที

ตลอดฤดูปลูกทำการพ่นสาร 8 และ 10 ครั้ง ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ทั้งนี้ในช่วงแรกจะพ่นสารในอัตราการพ่นต่ำ คือ 100 และ 15 ลิตร/ไร่ แต่เมื่อผักคะน้าโตขึ้น อายุประมาณ 45 วัน หลังงอกจะพ่นสารในอัตราสูง 120 และ 20 ลิตร/ไร่ สำหรับการพ่นแบบน้ำมากและน้ำน้อย ตามลำดับ

ตรวจนับแมลงศัตรูคะน้า ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนเจาะยอด หนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก โดยสุ่มนับแปลงย่อยละ 20 ต้น ก่อนทำการพ่นสารครั้งแรกและหลังพ่นสารทุกครั้ง วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการเก็บผลผลิตบนกลางแปลงย่อยละ 3 ตารางเมตร ตรวจนับจำนวนต้น ทำการตัดแต่งใบให้อยู่ในสภาพพร้อมส่งตลาด คัดแยกคุณภาพเป็น 3 ระดับ คือ

A : คะน้ามีก้านสมบูรณ์ ใบยอดไม่มีรอยทำลาย ใบนอกมีรอยทำลายไม่เกิน 5%

B : คะน้ามีก้านสมบูรณ์ ใบยอดมีรอยทำลายเล็กน้อย ใบนอกมีรอยทำลาย 5-15%

C : คะน้า มีก้านเล็กลง ใบยอดมีรอยทำลายเพิ่มขึ้น ใบนอกมีรอยทำลายมากกว่า 15%

ชั่งน้ำหนักผลผลิตที่ได้และนับจำนวนต้นที่คัดทิ้งด้วย

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่แปลงเกษตรกร อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองระหว่าง เดือนมีนาคม ถึง พฤษภาคม 2545

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองระหว่าง เดือน มีนาคม ถึง เมษายน 2546

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

แมลงศัตรูคะน้า (ตารางที่ 1) จากการตรวจนับแมลงศัตรูผักทุกชนิดที่พบ จำนวน 9 ครั้ง ตลอดฤดูปลูก พบแมลงศัตรูผักต่าง ๆ ดังนี้

หนอนใยผัก ***(Plutella xylostella*** Linneaus**)** มีการระบาดของหนอนใยผักมากกว่าเกณฑ์กำหนดการพ่นสาร คือ 0.15 ตัว/ต้น (มาลี และคณะ, 2542) โดยพบจำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 0.25 - 0.39 ตัว/ต้น การพ่นไส้เดือนฝอยทุกกรรมวิธีให้ผลในการควบคุมหนอนใยผักไม่แตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีไม่พ่นสาร โดยกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม แบบน้ำมากและน้ำน้อย กรรมวิธีไม่พ่นสาร กรรมวิธีพ่นสารแบบน้ำมากด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลังและเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง พบจำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 0.30, 0.34, 0.38, 0.39 และ 0.39 ตัว/ต้น ตามลำดับ โดยกรรมวิธีพ่นสารด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลมทั้งแบบน้ำมากและน้ำน้อย มีจำนวนหนอนใยผักเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อย ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม ซึ่งพบจำนวนหนอนใยผักเฉลี่ยต่ำสุด คือ 0.25 ตัว/ต้น (ตารางที่ 1)

หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ตลอดฤดูปลูก พบจำนวนหนอนกระทู้ผักเฉลี่ย 0.50 - 0.96 ตัว/ต้น โดยทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอยและสารฆ่าแมลง abamectin พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแปลงไม่พ่นสาร (ตารางที่ 1)

หนอนเจาะยอด (*Hellula undalis*) ตลอดฤดูปลูก พบจำนวนหนอนเจาะยอดเฉลี่ย 0.06 - 0.27 ตัว/ต้น โดยกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลง พ่นสารฆ่าแมลง abamectin และกรรมวิธีไม่พ่นสารมีจำนวนหนอนเจาะยอด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้น กรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง มีจำนวนหนอนเจาะยอดสูงสุด คือ 0.27 ตัว/ต้น และแตกต่างกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม ซึ่งพบจำนวนหนอนเจาะยอด 0.13 ตัว/ต้น ส่วนแปลงพ่นสารฆ่าแมลง พบจำนวนหนอนเจาะยอดเฉลี่ยต่ำสุด คือ 0.06 ตัว/ต้น (ตารางที่ 1)

ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta flexuosa*) ตลอดฤดูปลูกพบจำนวนด้วงหมัดผัก 0.97 - 1.45 ตัว/ต้น และทุกกรรมวิธีมีจำนวนด้วงหมัดผักไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ผลผลิตคะน้า (ตารางที่ 2)

จากการสุ่มเก็บผลผลิตคะน้าบนพื้นที่ 3 ตารางเมตร/แปลงย่อย ทำการตัดแต่งคะน้าให้อยู่ในสภาพพร้อมส่งตลาดได้โดยเกษตรกรเป็นผู้ตัดแต่ง หลังจากแยกคุณภาพเป็น 3 ระดับ คือ A, B, และ C ผลการทดลอง พบว่า จำนวนต้นและน้ำหนักคะน้าเฉลี่ยที่ระดับ A, B และ C รวมกันในทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง มีจำนวนต้นไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร คือมีจำนวนต้น 20.8 – 29.8 ต้น หรือน้ำหนัก 543 – 752 กรัม แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ซึ่งมีจำนวนต้น 102.2 ต้น หรือน้ำหนัก 4,416 กรัม (ตารางที่ 2)

ผลผลิตระดับ A การพ่นไส้เดือนฝอย มีผลผลิตคะน้าระดับ A เพียงกรรมวิธีเดียว คือ กรรมวิธีที่พ่นแบบน้ำมากด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลังจำนวน 1.6 ต้น หรือ 46 กรัม จากพื้นที่ 3 ตารางเมตร ในขณะที่กรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลงมีผลผลิตคะน้าระดับ A มีจำนวน 19 ต้น หรือน้ำหนัก 1140 กรัม (ตารางที่ 2)

ผลผลิตระดับ B มีจำนวนต้นเฉลี่ย 0.8 – 42.6 ต้น หรือน้ำหนักเฉลี่ย 34 – 1,966 กรัม โดยทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอย มีจำนวนต้นและน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม ซึ่งมีจำนวนต้นหรือน้ำหนักสูงสุดคือ 42.6 ต้น หรือ 1,966 กรัม (ตารางที่ 2)

ผลผลิตระดับ C มีจำนวนต้นเฉลี่ย 18.4 – 40.6 ต้น หรือน้ำหนัก 488 – 1,310 กรัม โดยทุกกรรมวิธีมีจำนวนต้นเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักของผลผลิตระดับ C พบว่าทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอยมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร แต่แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อย ซึ่งมีน้ำหนักสูงสุดคือ 1,310 กรัม (ตารางที่ 2)

จากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่า การพ่นไส้เดือนฝอย ทั้งแบบวิธีการพ่นแบบน้ำมากและน้ำน้อยด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่าง ๆ ไม่สามารถควบคุมแมลงศัตรูคะน้าที่สำคัญได้ ตลอดจนผลผลิตที่ได้ ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพก็ไม่แตกต่างทางสถิติกับการไม่พ่นสาร แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลงแบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม ทั้งนี้ผลผลิตจากกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอย มีการคัดทิ้งมากกว่า 75% ส่วนกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลงคัดทิ้ง 9% อย่างไรก็ดี ในการทดลองครั้งนี้ ทำการพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ทุก 3 วัน เช่นเดียวกับการพ่นไส้เดือนฝอย สำหรับสารฆ่าแมลง นับว่าถี่เกินไป จากคำแนะนำของกีฏและสัตววิทยา ควรพ่นทุก 4 วัน และจากผลการทดลองของ จีรนุชและคณะ, 2544 พบว่า ในเขตพื้นที่ปลูกผักอำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี การใช้สารฆ่าแมลง abamectin พ่นแบบน้ำน้อย เพื่อควบคุมแมลงศัตรูสำคัญของคะน้า โดยเฉพาะหนอนใยผัก สามารถลดปริมาณสารออกฤทธิ์ได้ 25% ดังนั้นในการทดลองครั้งที่ 2 จึงทำการทดลองซ้ำ โดยปรับเปลี่ยนเวลาพ่นสารในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า

และมีความชื้นสูงกว่า ตลอดจนปรับกรรมวิธี การพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบด้วยนั้น โดยการลดอัตราสารออกฤทธิ์ลง 25% ของอัตราแนะนำ

การทดลองที่ 2

แมลงศัตรูคะน้า (ตารางที่ 3) จากการตรวจนับแมลงศัตรูผักทุกชนิดที่พบ จำนวน 11 ครั้ง ตลอดฤดูปลูก พบแมลงศัตรูต่าง ๆ ดังนี้

หนอนใยผัก การระบาดของหนอนใยผักใกล้เคียงกับการทดลองครั้งที่ 1 คือ พบจำนวนหนอนใยผัก เฉลี่ย 0.28 - 0.44 ตัว/ต้น กรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่าง ๆ พบจำนวนหนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร ซึ่งมีจำนวนหนอนใยผักสูงสุด 0.44 ตัว/ต้น ส่วนกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำมากด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม พบจำนวนหนอนใยผัก 0.35 ตัว/ต้น และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับแปลงพ่นสารฆ่าแมลงแบบน้ำน้อย ซึ่งพบจำนวนหนอนใยผักน้อยที่สุดคือ เฉลี่ย 0.28 ตัว/ต้น (ตารางที่ 3)

หนอนกระทู้ผัก ตลอดฤดูปลูกพบจำนวนหนอนกระทู้ผักเฉลี่ยจำนวน 0.30 - 0.81 ตัว/ต้น โดยทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอย และพ่นสารฆ่าแมลง abamectin มีจำนวนหนอนกระทู้ผักไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแปลงไม่พ่นสาร (ตารางที่ 3)

หนอนเจาะยอด ตลอดฤดูปลูก พบจำนวนหนอนเจาะยอดเฉลี่ย 0.02 - 0.20 ตัว/ต้น โดยกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลงมีจำนวนหนอนเจาะยอดน้อยที่สุด คือ เฉลี่ย 0.02 ตัว/ต้น และมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยและไม่พ่นสาร กรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำมาก ทั้ง 3 วิธี พบ จำนวนหนอนเจาะยอดรองลงมาและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ได้แก่ การพ่นด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง, เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม (หัวฉีดฝักบัว) และการพ่นด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง พบจำนวนหนอนเจาะยอดเฉลี่ย 0.14, 0.15 และ 0.17 ตัว/ต้น และแตกต่างทางสถิติกับแปลงไม่พ่นสาร ยกเว้นกรรมวิธีที่พ่นด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง ขณะเดียวกันกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม พบจำนวนหนอนเจาะยอดเฉลี่ย 0.19 ตัว/ต้น โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นแบบน้ำมากตลอดจนไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารและกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำมากด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูงด้วย (ตารางที่ 3)

ด้วงหมัดผัก ตลอดฤดูปลูกพบจำนวนด้วงหมัดผักเฉลี่ย 0.46 - 0.75 ตัว/ต้น โดยทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3)

ผลผลิตคะน้า

จากการเก็บผลผลิตบนพื้นที่ 3 ตารางเมตร/แปลงย่อย ผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1 กล่าวคือ ทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือนฝอยกับกรรมวิธีไม่พ่นสารให้ผลผลิตระดับคุณภาพ A, B, C มีจำนวนต้น และน้ำหนักรวมไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือมีจำนวนต้น 26.8 – 37.8 ต้น หรือน้ำหนัก 652 – 1,089 กรัม แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ซึ่งให้ผลผลิตมีจำนวนต้น และน้ำหนักสูงสุด คือจำนวน 92.0 ต้น หรือน้ำหนัก 3,008 กรัม (ตารางที่ 4)

ผลผลิตระดับ A พบน้อยมากคือจากกรรมวิธีพ่นสารแบบน้ำน้อย ด้วยสารฆ่าแมลง abamectin และไส้เดือนฝอยเพียงกรรมวิธีละ 1 ต้น หรือน้ำหนัก 32 และ 24 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ผลผลิตระดับ B ทุกกรรมวิธีที่พ่นด้วยไส้เดือนฝอยมีจำนวนต้น และน้ำหนักผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือมีจำนวนต้น 6.4 – 10.8 ต้น หรือมีน้ำหนัก 210 – 344 กรัม แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ซึ่งให้ผลผลิตระดับ B มีจำนวนต้น และน้ำหนักสูงสุดคือ 19.6 ต้น หรือ 654 กรัม ทั้งนี้กรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำมากด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง และเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูงให้ผลผลิตจำนวนต้น และน้ำหนักไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร คือจำนวน 6.4, 7.4 และ 1.2 ต้น และ น้ำหนัก 210, 248 และ 48 กรัม ตามลำดับ โดยน้ำหนักผลผลิตระดับ B ของกรรมวิธีพ่นไส้เดือนฝอยแบบน้ำน้อย ซึ่งมีน้ำหนัก 328 กรัม ก็ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่พ่นสารด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 4)

ผลผลิตระดับ C พบว่าทุกกรรมวิธีที่พ่นไส้เดือยฝอยให้ผลผลิตระดับ C ทั้งในด้านจำนวนต้น และน้ำหนักไม่แตกต่างกับกรรมวิธีไม่พ่นสาร กล่าวคือมีจำนวนต้น 19.8 – 27.0 ต้น หรือ 604 – 850 กรัม แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ซึ่งมีจำนวน 72.4 ต้น หรือน้ำหนัก 3,008 กรัม (ตารางที่ 4)

อย่างไรก็ตาม จากการใช้ไส้เดือนฝอยไม่ว่าจะด้วยวิธีการพ่นแบบใดผลผลิตที่ได้ก็ยังต่ำมาก มีการคัดทิ้ง 75% ขึ้นไป ในขณะที่แปลงใช้สารฆ่าแมลง คัดทิ้งประมาณ 49% ในการทดลองครั้งที่ 2 นี้ ได้พยายามเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ไส้เดือนฝอยด้วยการใช้สารจับใบ ซึ่งกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าได้ผลดี ตลอดจนปรับเวลาการพ่นเป็นตอนเช้า แต่เนื่องจากพบอุปสรรคจากฝนตกในช่วงเช้า ทำให้ต้องพ่นในตอนเย็นเป็นบางครั้ง แต่ก็ได้ปรับเวลาการพ่นให้ช้าลงจากเดิม คือ หลังเวลา 18:00 นาที มีการตรวจวัดอุณหภูมิ, ความชื้นสัมพัทธ์ ให้มีความเหมาะสมกับไส้เดือนฝอย โดยอุณหภูมิเฉลี่ยในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 อยู่ระหว่าง 29 - 31.5° c และ 29 - 30.5°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70 และ 76% ตามลำดับ แต่ก็พบว่า การใช้ไส้เดือนฝอย ทั้งวิธีการพ่นสารแบบน้ำมากและน้ำน้อยไม่สามารถควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญของคะน้าได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ดำรงและคณะ (2544) ที่ทดลองกับคะน้าโดยการพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงที่อัตรา 2,000, 3,000 4,000 และ 5,000 ตัว/มิลลิลิตร พ่นในอัตรา 80-100 ลิตร/ไร่ ทำการพ่นทุก 4 วัน พบว่า การพ่นไส้เดือนฝอยทั้ง 4 อัตรา ไม่สามารถควบคุมแมลงศัตรูทั้ง 4 ชนิดได้ และผลผลิตทั้งหมดไม่สามารถส่งตลาดได้

จากการทดลองทั้ง 2 ครั้ง พบว่าการพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม ทั้งอัตราแนะนำ และ ¾ ของอัตราแนะนำ สามารถควบคุมแมลงศัตรูคะน้าได้ดี และแตกต่างจากการพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงกับการไม่พ่นสาร เป็นการยืนยันผลการทดลองของ จีรนุช และคณะ, 2544 อย่างไรก็ตามการทดลองครั้งนี้ทำการพ่นสารฆ่าแมลง abamectin ทุก 3 วัน อาจจะถี่เกินไปสำหรับสารฆ่าแมลง สำหรับการพ่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ทั้งแบบน้ำมากและน้ำน้อยด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ ในอัตรา 4,000 ตัว/มิลลิลิตร พ่นทุก 3 วัน ให้ผลในการควบคุมแมลงศัตรูคะน้า และให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน

ทางสถิติกับการไม่พ่นสาร การใช้ไส้เดือนฝอยซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตน่าจะเหมาะกับพืชที่มีลักษณะใบห่อมากกว่า เช่น กะหล่ำปลี เพื่อสามารถป้องกันแสงแดดได้ และมีความชื้น การพ่นแบบน้ำน้อยไม่เหมาะกับการพ่นไส้เดือนฝอย เนื่องจากละอองสารจะมีขนาดเล็กมาก เมื่อติดอยู่ที่ใบแล้ว ละอองสารแห้งเร็ว โอกาสที่ไส้เดือนฝอยตายก่อนน่าจะมีมากกว่า การพ่นสารแบบน้ำมากจะเหมาะกว่า

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่าการพ่นไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงทั้งแบบน้ำมาก และน้ำน้อยด้วย เครื่องพ่นสารแบบต่าง ๆ ในอัตรา 4,000 ตัว/มิลลิลิตร พ่นทุก 3 วัน ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า ถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ควรเพิ่มอัตราการใช้มากกว่า 5,000 ตัว/มิลลิลิตร ใช้การพ่นสารแบบน้ำมากโดยเพิ่มอัตราการพ่นมากกว่า 120 ลิตร/ไร่ เพื่อให้ดินและต้นพืชมีความชุ่มชื้นมากขึ้น ก่อนพ่นสารควรรดน้ำในแปลงพอให้ชุ่มอาจจะต้องพ่นให้ถี่ขึ้น แต่ก็ต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งในด้านของสาร เวลา แรงงาน ในการปฏิบัติจะคุมกันหรือไม่ หรืออาจจะใช้ร่วมกับวิธีการอื่น

เอกสารอ้างอิง

จีรนุช เอกอำนวย ดำรง เวชกิจ สมชาย อามีน อำพล แก้วทอง ประคอง ภมร . 2542. ศึกษาวิธีการพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า. รายงานผลวิจัยประจำปี 2542, กลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า19

จีรนุช เอกอำนวย ดำรง เวชกิจ อำพล แก้วทอง ไพศาล รัตนเสถียร . 2544. ศึกษาประสิทธิภาพอัตราสารออกฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูคะน้า. รายงานผลวิจัยประจำปี 2544. กลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช , กองกีฏและสัตววิทยา , กรมวิชาการเกษตร . หน้า 1 - 13 . (อยู่ระหว่างการรวมเล่ม)

ดำรง เวชกิจ. 2544. ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูผักในคะน้า . รายงานผลการทดลองเสนอสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.). กรุงเทพฯ. 4 หน้า

มาลี ชวนะพงศ์ จีรนุช เอกอำนวย ดำรง เวชกิจ รจนา สุรการ สุปราณี อิ่มพิทักษ์. 2542. เทคนิคการพ่นสารป้องกันกำจัดหนอนใยผัก ***Plutella xylostella*** (Linneaus) ในคะน้า. ว. กีฏ. สัตว. 21(4) : 243-251

ตารางที่ 1 จำนวนเฉลี่ยของแมลงศัตรูคะน้าตลอดฤดูปลูกจากการตรวจนับ 9 ครั้ง เมื่อพ่นด้วยไส้เดือยฝอยศัตรูแมลง และสาร ฆ่าแมลง abamectin ด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม – พฤษภาคม 2545

วิธีการ[1/]	จำนวนแมลงศัตรูคะน้าเฉลี่ย (ตัว/ต้น)			
	หนอนใยผัก	หนอนกระทู้	หนอนเจาะยอด	ด้วงหมัดผัก
T1	0.39 b[2/]	0.96	0.12 a	1.32
T2	0.39 b	0.66	0.27 b	1.45
T3	0.30 ab	0.50	0.12 a	1.43
T4	0.34 ab	0.67	0.13 ab	1.04
T5	0.25 a	0.53	0.06 a	0.97
T6	0.38 b	0.66	0.12 a	1.28
CV (%)	55.02	77.41	190.03	58.11

[1/] T1 พ่นแบบน้ำมาก ด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง อัตราพ่น 100-120 ลิตร/ไร่

T2 พ่นแบบน้ำมาก ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง อัตราพ่น 100 – 120 ลิตร/ไร่

T3 พ่นแบบน้ำมาก ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม อัตราพ่น 100 – 120 ลิตร/ไร่

T4 พ่นแบบน้ำน้อย ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม อัตราพ่น 15 – 20 ลิตร/ไร่

T5 พ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม ใช้อัตราสารออกฤทธิ์ 3.60 – 4.32 กรัม/ไร่ อัตราพ่น 15-20 ลิตร/ไร่

T6 ไม่พ่นสาร

[2/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ P = 0.05% โดย DMRT

ตารางที่ 2 จำนวนต้นและน้ำหนักผลผลิตคะน้าตามระดับคุณภาพ A, B และ C ที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม – พฤษภาคม 2545

กรรมวิธี[1/]	จำนวนต้นเฉลี่ย (ต้น/ 3 ตร.ม.)				จำนวนต้นที่คัดทิ้ง (%)	น้ำหนักเฉลี่ย (ก./ 3 ตร.ม.)			
	A [2/]	B	C	รวม		A	B	C	รวม
T1	1.6	2.2 b [3/]	25.2	29.0 b	99 (77)	46	58 b	636 b	740 b
T2	0	2.4 b	18.4	20.8 b	95 (82)	0	75 b	468 b	543 b
T3	0	3.6 b	24.6	28.2 b	93 (77)	0	116 b	470 b	586 b
T4	0	5.4 b	24.4	29.8 b	97 (76)	0	170 b	582 b	752 b
T5	19	42.6 a	40.6	102.2 a	11 (9)	1,140	1,966 a	1,310 a	4,416 a
T6	0	0.8 b	20.6	21.4 b	94 (82)	0	34 b	548 b	582 b
CV (%)	-	65.9	45.6	38.8	-	-	52.3	47.5	27.0

[1/] เหมือนตารางที่ 1

[2/] A มีรอยทำลายไม่เกิน 5%

B มีรอยทำลาย 5-15%

C มีรอยทำลายมากกว่า 15%

[3/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ P = 0.05% โดย DMRT

ตารางที่ 3 จำนวนเฉลี่ยของแมลงศัตรูคะน้าตลอดฤดูปลูก จากการตรวจนับ 11 ครั้ง เมื่อพ่นด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และสารฆ่าแมลง abamectin ด้วยเครื่องพ่นสารแบบต่างๆ อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม – เมษายน 2546

วิธีการ[1/]	จำนวนแมลง (ตัว/ต้น)			
	หนอนใยผัก	หนอนกระทู้ผัก	หนอนเจาะยอด	ด้วงหมัดผัก
T1	0.39 b [2/]	0.59	0.14 b	0.58
T2	0.39 b	0.49	0.17 bcd	0.65
T3	0.35 ab	0.30	0.15 bc	0.75
T4	0.37 b	0.63	0.19 cd	0.68
T5	0.28 a	0.81	0.02 a	0.46
T6	0.44 b	0.52	0.20 d	0.75
CV (%)	41.76	112.92	55.26	70.60

[1/] T1 พ่นแบบน้ำมากด้วยเครื่องพ่นสารแบบสูบโยกสะพายหลัง อัตราพ่น 100 – 120 ลิตร/ไร่
T2 พ่นแบบน้ำมากด้วยเครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง อัตราพ่น 100 – 120 ลิตร/ไร่
T3 พ่นแบบน้ำมากด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม อัตราพ่น 100 – 120 ลิตร/ไร่
T4 พ่นแบบน้ำน้อยด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังแบบใช้แรงลม อัตราพ่น 15 – 20 ลิตร/ไร่
T5 พ่นสารฆ่าแมลง abamectin แบบน้ำน้อย ด้วยเครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลัง แบบใช้แรงลม ใช้อัตราสารออกฤทธิ์ 2.70 – 3.24 กรัม/ไร่ (3/4 ของอัตราแนะนำ) อัตราพ่น 15 – 20 ลิตร/ไร่
T6 ไม่พ่นสาร

[2/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ P = 0.05% โดย DMRT

ตารางที่ 4 จำนวนต้นและน้ำหนักผลผลิตคะน้าตามระดับคุณภาพ A, B และ C ที่แปลงเกษตรกรอำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม – เมษายน 2546

กรรมวิธี[1/]	จำนวนต้นเฉลี่ย (ต้น/3 ตร.ม.)				จำนวนต้นที่	น้ำหนักเฉลี่ย (ก./3 ตร.ม.)			
	A [2/]	B	C	รวม	คัดทิ้ง (%)	A	B	C	รวม
T1	0	6.4 bc[3/]	26.4 b	32.8 b	135 (80)	0	210 bc	850 b	1,060 b
T2	0	7.4 bc	19.8 b	27.2 b	102 (79)	0	248 bc	608 b	856 b
T3	0	10.8 b	27.0 b	37.8 b	116 (75)	0	344 b	745 b	1,089 b
T4	1	10.6 b	23.0 b	33.6 b	134 (80)	24	328 bc	648 b	1,000 b
T5	1	19.6 a	72.4 a	92.0 a	90 (49)	32	654 a	2,322 a	3,008 a
T6	0	1.2 c	25.6 b	26.8 b	131 (83)	0	48 c	604 b	652 b
CV (%)	-	55.7	35.9	147.8	-	-	65.4	39.3	159.8

[1/] เหมือนตารางที่ 3

[2/] เหมือนตารางที่ 2

[3/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละสดมภ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ P = 0.05% โดย DMRT

การบริหารความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผักในพืชผักตระกูลกะหล่ำ

Insecticide Resistant Management of Diamondback Moth,*Plutella xylostella* Linn. on Crucifers Crop

พรรณเพ็ญ ชโยภาส **ปิยรัตน์ เขียนมีสุข**
ทวีศักดิ์ ชโยภาส **จิราภรณ์ ทองพันธ์**
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**

บทคัดย่อ

การพ่นสารฆ่าแมลงแบบสลับ เพื่อป้องกันกำจัดหนอนใยผักในแปลงทดลอง ทำการทดลองที่สวนเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี แหล่งที่พบปัญหาการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผักค่อนข้างสูง วางแผนการทดลองแบบRCB 5กรรมวิธี 4ซ้ำ โดยพ่นสารฆ่าแมลง spinosad (Success 12 % SC)อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร สลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย,*Bacillus thuringiensis* (Florbac 35,000 i.u. WDG) อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตรและสารสกัดสะเดา กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารฆ่าแมลง 1 ครั้งสลับด้วยการพ่น เชื้อแบคทีเรีย 1 ครั้ง กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารฆ่าแมลง 2 ครั้งสลับด้วยการพ่น เชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารฆ่าแมลง 1 ครั้งสลับด้วยการพ่นเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารฆ่าแมลง 1 ครั้งสลับด้วยการพ่น สารสกัดจากสะเดา 1 ครั้ง แต่ละกรรมวิธี พ่นวันเว้น 2 วัน และกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลง ทดลองตลอดฤดูปลูกคะน้า พบว่า ผลผลิตคะน้าเมื่อเสร็จสิ้นฤดูปลูก กรรมวิธีที่ได้ผลผลิตสูงสุด ใบและลำต้นมีคุณภาพดีคือ การพ่นด้วยสารฆ่าแมลง spinosad สลับกับการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย แบบ 2 : 2 คือการพ่นด้วยสารฆ่าแมลง 2 ครั้ง สลับกับการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง ผลผลิตที่ได้ 4,955 กรัมต่อตารางเมตร(792.80 กิโลกรัมต่อไร่) คุณภาพของคะน้ากรรมวิธีที่มีการพ่นสารสลับอยู่ในอันดับดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างทางสถิติจากคุณภาพของคะน้าของกรรมวิธีไม่พ่นสารฆ่าแมลง

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06010 004

คำนำ

พืชผักตระกูลกะหล่ำ (Crucifers ,*Brassica* spp.) เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากต้องใช้บริโภคเป็นประจำทุกวันภายในประเทศ มีการส่งออกบางส่วน พื้นที่ปลูกทุกภาคของประเทศไทย 343,000 ไร่ (ปิยรัตน์และคณะ,2542) พืชตระกูลนี้เช่น กะหล่ำปลี คะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียวปลี กะหล่ำดอก ผักกาดหัว มีปัญหาที่สำคัญในการผลิตคือ แมลงศัตรูพืช ทำให้ผลผลิตสูญเสียคุณภาพ แมลงศัตรูที่สำคัญได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะยอดกะหล่ำ และด้วงหมัดผัก โดยเฉพาะหนอนใยผัก จัดเป็นแมลงศัตรูสำคัญที่มีความสามารถในการพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้รวดเร็ว พื้นที่ปลูกผักรอบๆกรุงเทพฯ ประสบปัญหาหนอนดื้อยา หรือหนอนใยผักมีอัตราความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงสูง พรรณเพ็ญและคณะ(2542และ2544) รายงานว่าในแหล่งปลูกผักจังหวัดนนทบุรีประสบปัญหาดังกล่าว โดยหนอนใยผักสายพันธุ์ไทรน้อยมีอัตราความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง fipronil ซึ่งเคยเป็นสารฆ่าแมลงที่ใช้ได้ผลดี สูงขึ้นจาก 36.59 เท่าในปี 2542 เป็น138.27 เท่าของสายพันธ์อ่อนแอในปี 2544 หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง มีอัตราความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง abamectin สูงขึ้นจาก 14.11 เท่าในปี2542 เป็น 41.09 เท่าของสายพันธุ์อ่อนแอในปี 2544 การที่หนอนใยผักพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็วเพราะใช้สารฆ่าแมลงชนิดเดิมเป็นประจำและใช้บ่อยครั้งเกินความจำเป็น ประกอบกับหนอนใยผัก มีวงจรชีวิตสั้น มีพืชอาหารกินตลอดปี สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งตัวหนอนมีใยสามารถทิ้งตัวลงดิน หรือหลบหลีกการถูกสารฆ่าแมลง ทำให้รอดชีวิตไปได้ และพัฒนาสร้างความต้านทาน หากไม่มีการแก้ไข เกษตรกรจะเสียค่าใช้จ่ายในการพ่นสารฆ่าแมลงสูงขึ้น เพราะต้องพ่นอัตราความเข้มข้นสูงและพ่นบ่อยครั้ง พิษตกค้างในผลผลิตมีมากขึ้น เป็นอันตรายต่อการบริโภคและสิ่งแวดล้อม สามารถแก้ปัญหาด้วยการบริหารความต้านทานโดยการใช้สารฆ่าแมลงต่างกลุ่มพ่นสลับกัน (The University of Reading ,1995) ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เชื้อแบคทีเรียพ่นสลับกับสารฆ่าแมลงหรือใช้สารสกัดจากสะเดาพ่นสลับกับสารฆ่าแมลง จะช่วยชะลอความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผัก เป็นเรื่องที่ควรศึกษา

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์

- เมล็ดพันธุ์ผักคะน้า ปุ่ย ต้นกล้ากะหล่ำปลี
- สารฆ่าแมลง spinosad (Success 12 % SC) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Florbac WDG 35,000 i.u.)
- สารสกัดจากสะเดา

- ที่พ่นสารฆ่าแมลงแบบสูบชัก
- กระบอกตวง(cylinder) ที่ดูดสารฆ่าแมลง(pipette) ถ้วยตวง(beaker)ขนาด 250 600 และ 1000 มิลลิลิตร
- กล่องพลาสติกใสขนาด 8 x 12 x 3 นิ้ว และ กล่องพลาสติกใสกลมขนาด 4.5 นิ้ว
- สาร acetone สารจับใบ น้ำกลั่น
- หนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอจากประเทศญี่ปุ่น(Osaka Susceptible Strain : OSS)
- ตารางไม้ไผ่ขนาด 1 x 1 เมตร มีด เครื่องชั่ง

วิธีการ

1.วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธีๆละ 4 ซ้ำ

1.1 กรรมวิธีที่ 1 พ่น spinosad อัตรา 40 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร สลับกับพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย อัตรา 80 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตรพ่นทุก 4 วันอัตราส่วนที่พ่นสลับคือ 1 : 1

1.2 กรรมวิธีที่ 2 พ่น spinosad อัตรา 40 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นทุก 4 วัน 2 ครั้ง สลับกับพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย อัตรา 80 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นทุก 4 วัน 2 ครั้ง อัตราส่วนที่พ่นสลับคือ 2 : 2

1.3 กรรมวิธีที่ 3 พ่น spinosad อัตรา 40 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร 1 ครั้ง สลับกับพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย อัตรา 80 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร 2 ครั้ง พ่นทุก 4 วัน อัตราส่วนที่พ่นสลับคือ 1 : 2

1.4 กรรมวิธีที่ 4 พ่น spinosad อัตรา 40 มล. ต่อน้ำ 20 ลิตร สลับกับพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดา อัตรา 80 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นทุก 4 วัน อัตราส่วนที่พ่นสลับคือ 1 : 1

1.5 กรรมวิธีที่ 5 ไม่พ่น

2. ปลูกคะน้าในแปลงย่อยขนาด 1.5 x 3.5 เมตร เว้นระยะระหว่างแปลงย่อย 0.50 เมตร ใส่ปุ๋ย ที่ระยะเวลา 15 25 และ 35 วันหลังปลูก

3. พ่นสารฆ่าแมลง เชื้อแบคทีเรีย และสารสกัดจากสะเดา พ่นวันเว้น 2 วัน ตามกรรมวิธีต่างๆ ตลอดฤดูปลูก สุ่มนับหนอนใยผักจากคะน้า 30 ต้นแต่ละซ้ำก่อนพ่นและในกรรมวิธีที่ไม่พ่น

4. บันทึกจำนวนหนอนที่พบ

5. บันทึกผลผลิต เมื่อคะน้าโตเต็มที่ ใช้ตารางไม้พื้นที่ 1 ตารางเมตรสุ่มวางลงในแปลงทดลอง

แต่ละซ้ำ ใช้มีดตัดต้นคะน้า ริดใบล่างสุดออก 2-3 ใบ ชั่งน้ำหนัก

6. บันทึกน้ำหนักผลผลิตของคะน้าแต่ละกรรมวิธี

7. นำน้ำหนักผลผลิตที่ได้ในแต่ละกรรมวิธี วิเคราะห์ผลแตกต่างทางสถิติ

8. กำหนดคุณภาพผลผลิตคะน้าที่ได้ในแต่ละกรรมวิธี โดยใช้มาตรฐานดังนี้

การจัดลำดับคุณภาพแบ่งออกเป็น 5 ระดับ (โดยดูจากใบที่1-3 จากยอดของต้นคะน้าในพื้นที่สุ่ม 1 ตารางเมตรของแต่ละซ้ำ)

ระดับ 0 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผักมากกว่า 80%

ระดับ 1 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผัก 51-80%

ระดับ 2 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผัก 21-50%

ระดับ 3 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผักไม่เกิน 20%

ระดับ 4 ต้นคะน้าไม่มีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผัก 100%

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือนตุลาคม 2545 ถึง เดือนกันยายน 2546 ที่สวนผักเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี

ผลการทดลอง

ปี 2545 จากการทดลองปลูกคะน้าเพื่อทำการทดลองการพ่นสารฆ่าแมลงแบบสลับ เพื่อชะลอการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผัก ที่สวนผักเกษตรกร อำเภอสายไหม กรุงเทพฯ พบว่ามีการเข้าทำลายของหนอนใยผักในปริมาณน้อยมากไม่สามารถเปรียบเทียบตามกรรมวิธีต่างๆได้

ปี 2546 ทำการปลูกคะน้าแบบหว่านในแปลงที่เตรียมดินเสร็จเรียบร้อยแล้ว ขนาดแปลงย่อย 3.5 x1.5 เมตร เว้นระยะระหว่างแปลงย่อย 0.5 เมตร เมื่อคะน้ามีอายุ 1 เดือน พ่น spinosad อัตรา 40 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร เพื่อให้ต้นสามารถเจริญเติบโตได้เท่ากันทุกกรรมวิธี ใช้ในการเปรียบเทียบต่อไปได้

ผลการทดลองก่อนพ่นสารสลับทุกกรรมวิธีและกรรมวิธีที่ไม่พ่นสาร นับหนอนใยผักในแต่ละกรรมวิธีก่อนการพ่นครั้งที่ 1 พบจำนวนหนอนใยผักในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติก่อนการพ่นครั้งที่ 2 พบว่ากรรมวิธีที่ 2 มีจำนวนหนอนใยผักเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 4.5 ตัว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกรรมวิธีที่ไม่พ่นสารพบหนอนเฉลี่ย 12.75 ตัว ก่อนการพ่นครั้งที่ 3 พบจำนวนหนอนใยผักกรรมวิธีที่ 1 , 2 , 3 และ 4 เฉลี่ย 1.75 ,2.25 ,4.75 และ 3.5 ตัวตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกรรมวิธีที่ไม่พ่นสาร ซึ่งพบหนอน 9.75 ตัว ก่อนการพ่นครั้งที่ 4 และ 5 พบจำนวนหนอนใยผักในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความ

แตกต่างกันทางสถิติ ก่อนการพ่นครั้งที่ 6 พบจำนวนหนอนใยผักกรรมวิธีที่ 2 เฉลี่ย 1 ตัว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 1 , 3 ,4 และ 5 ที่พบหนอนเฉลี่ย 3.75 , 3.5 , 3.5 และ4.75 ตัวตามลำดับ ก่อนการพ่นครั้งที่ 7 พบจำนวนหนอนใยผักในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1 , ภาพที่ 1)

พ่นสารฆ่าแมลง spinosad อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร สลับกับพ่นเชื้อแบคทีเรีย อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารฆ่าแมลง 1 ครั้งสลับด้วยการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย 1 ครั้ง ให้ผลผลิต 4.44 กิโลกรัม กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารฆ่าแมลง 2 ครั้งสลับด้วยการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง ให้ผลผลิต 4.96 กิโลกรัม กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารฆ่าแมลง 1 ครั้งสลับด้วยการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง ให้ผลผลิต 4.36 กิโลกรัม กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารฆ่าแมลง spinosad อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร 1 ครั้งสลับด้วยการพ่นด้วยสารสกัดจากสะเดาอัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร 1 ครั้ง ให้ผลผลิต 4.84กิโลกรัม กรรมวิธีที่ 5 ไม่มีการพ่น ให้ผลผลิต 3.89 กิโลกรัม กรรมวิธีที่ 2 และ4 ให้ผลผลิตแตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 5 (ตารางที่ 2, ภาพที่ 2) กรรมวิธีที่ได้ผลผลิตมากที่สุด ใบและลำต้นมีคุณภาพที่ดีคือ กรรมวิธีที่ 2 การพ่นด้วยสารฆ่าแมลง spinosad สลับกับการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย ในรูปแบบ 2 : 2 คือการพ่นด้วยสารฆ่าแมลง 2 ครั้งสลับกับการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง ซึ่งให้ผลผลิต 4.96 กิโลกรัมต่อตารางเมตร (792.80 กิโลกรัมต่อไร่) คุณภาพของคะน้ากรรมวิธีที่มีการพ่นสารสลับอยู่ในอันดับดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 5 (ไม่ได้พ่นสาร) ผลผลิตคะน้าในกรรมวิธีนี้จะถูกหนอนใยผักทำลายรุนแรง ใบทุกใบจะเป็นรูพรุนจัดอยู่ในระดับ 0 ส่งขายตลาดไม่ได้ (ตารางที่ 2 , ภาพที่ 3)

สรุปผลการทดลอง

ก่อนพ่นสารสลับทุกกรรมวิธีและกรรมวิธีที่ไม่พ่นสาร นับหนอนใยผักในแต่ละกรรมวิธี ก่อนการพ่นครั้งที่ 1 พบจำนวนหนอนใยผักในแต่ละกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ก่อนการพ่นครั้งที่ 2 ,3 และ 6 พบว่าจำนวนหนอนใยผัก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ก่อนการพ่นครั้งที่ 2 และ 6 กรรมวิธีที่ 2 มีจำนวนหนอนใยผักเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 4.5 และ 1 ตัว ตามลำดับ แสดงว่ากรรมวิธีที่ 2 ทำให้ปริมาณหนอนใยผักน้อยและใช้ตัดสินว่าดีกว่ากรรมวิธีอื่น

ผลผลิตกรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยสารฆ่าแมลง spinosad สลับกับการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย ในรูปแบบ 2 : 2 คือการพ่นด้วยสารฆ่าแมลง 2 ครั้ง สลับกับการพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย 2 ครั้ง ให้ผลผลิตมากที่สุด คือ 4,955 กรัม ต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตรและมีคุณภาพจัดอยู่ในระดับดีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกรรมวิธีที่ไม่พ่นสาร

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, นงพร กิจบำรุง, จักรพงศ์ พิริยพล, ศรีสุดา โท้ทอง, สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น, ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ , อุราพร ใจเพ็ชร, ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย, สมรวย รุ่งรัตนวารี และ สัจจะ ประสงค์ทรัพย์ . 2542 . แมลงศัตรูผัก. เอกสารวิชาการ กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ, กองกีฏและสัตววิทยา , กรมวิชาการเกษตร. 97 หน้า.

พรรณเพ็ญ ชโยภาส , ปิยรัตน์ เขียนมีสุข ,ทวีศักดิ์ ชโยภาส, กรรณิการ์ เพ็งคุ้ม และสัญญาณี ศรีคชา. 2542 .การตรวจความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนใยผักในแหล่งปลูกผักภาคต่างๆ . เอกสารวิชาการรายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ประจำปี 2542 .กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชสวนอุตสาหกรรม กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-15.

พรรณเพ็ญ ชโยภาส , ปิยรัตน์ เขียนมีสุข , ทวีศักดิ์ ชโยภาส, อัจฉรา ตันติโชดก และจิราภรณ์ ทองพันธ์ . 2544. การตรวจการต้านทานต่อสารฆ่าแมลงประเภทเชื้อแบคทีเรียของหนอนใยผักในกะหล่ำปลี. เอกสารวิชาการ รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ประจำปี 2544 .กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชสวนอุตสาหกรรม กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-12. The University of Reading. 1995. Insecticide resistance detection and management. UK. 139 pp.

ตารางที่ 1 จำนวนหนอนใยผัก ก่อนการพ่นสารสลับแต่ละครั้งและในกรรมวิธีที่ไม่พ่นสาร

กรรมวิธี	จำนวนหนอนเฉลี่ย*(ตัว)ในแต่ละครั้งที่พ่นสารกรรมวิธีต่างๆ1/						
	1	2	3	4	5	6	7
1	5.5	8.25ab	1.75a	2.5	13.5	3.75b	9.25
2	5	4.5a	2.25a	1.75	8.75	1a	6.75
3	6.25	6ab	4.75a	1.5	8.75	3.5b	8.25
4	5	7.25ab	3.5a	1.75	9.25	3.5b	12.25
5	7.25	12.75b	9.75b	3.5	10	4.75b	12.25

* ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ เมื่อสุ่มนับจากต้นคะน้า 30 ต้นต่อซ้ำ

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ถ้าตามด้วยอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยDuncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 2 ผลผลิตและคุณภาพคะน้าหลังการทดลองบริหารความต้านทาน
ที่สวนเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี ปี2546

กรรมวิธี	ผลผลิตเฉลี่ย* (กรัม/ตารางเมตร)	คุณภาพ **
1	4,440 ab	3a
2	4,955 a	3.25a
3	4,360 ab	3.5a
4	4,838 a	3a
5	3,895 b	0b

* ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ เมื่อสุ่มนับจากต้นคะน้า 30 ต้นต่อซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ถ้าตามด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยDuncan New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

**การจัดลำดับคุณภาพแบ่งออกเป็น 5 ระดับ (โดยดูจากใบที่1-3 จากยอดของต้นคะน้าในพื้นที่สุ่ม 1 ตารางเมตร)

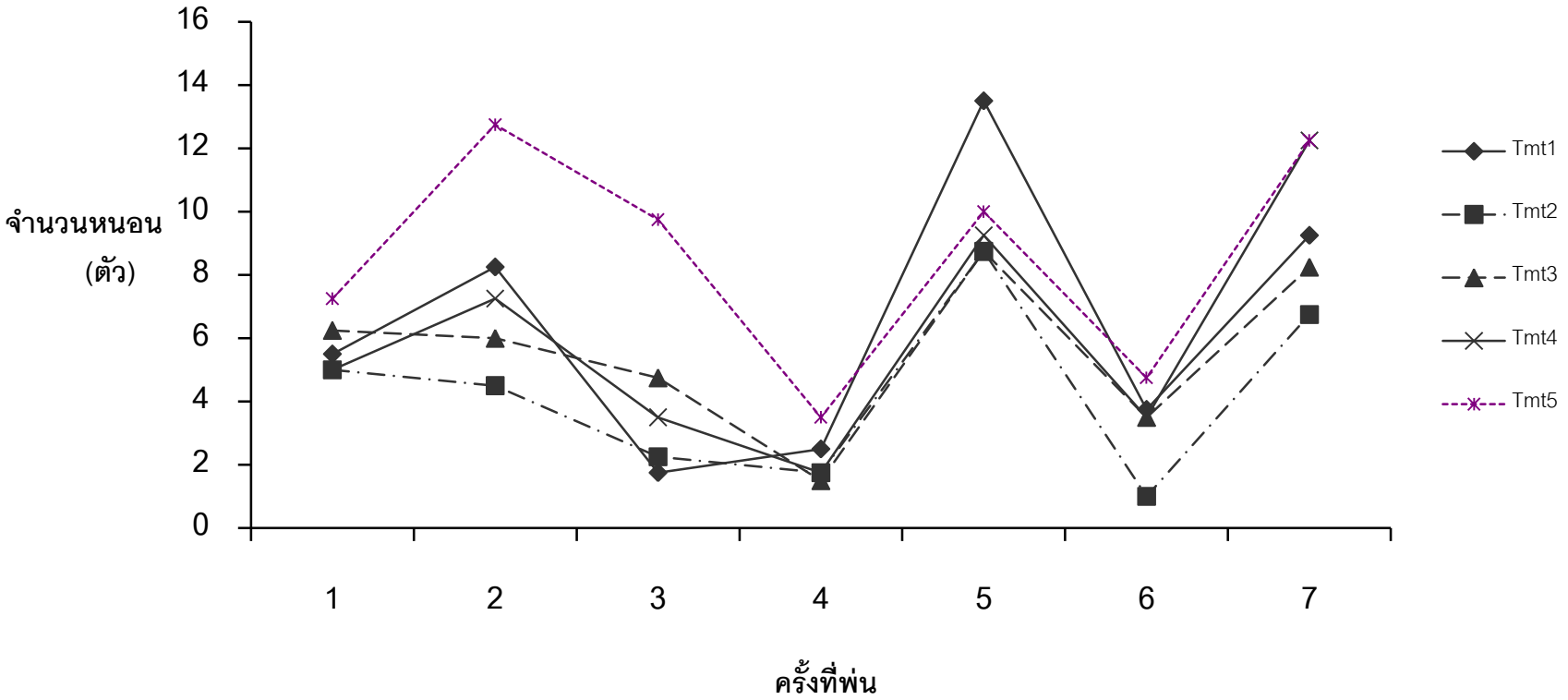
ระดับ 0 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผักมากกว่า 80%

ระดับ 1 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผัก 51-80%

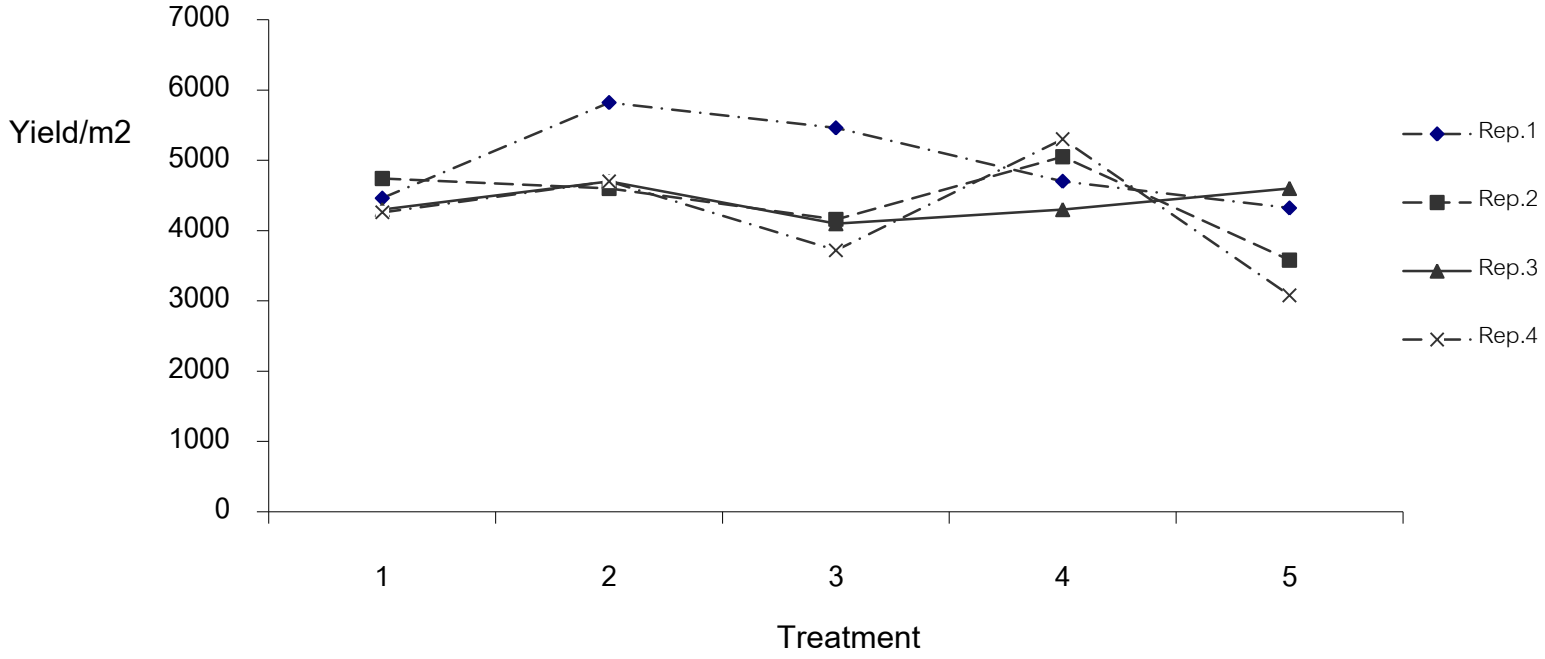
ระดับ 2 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผัก 21-50%

ระดับ 3 ต้นคะน้ามีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผักไม่เกิน 20%

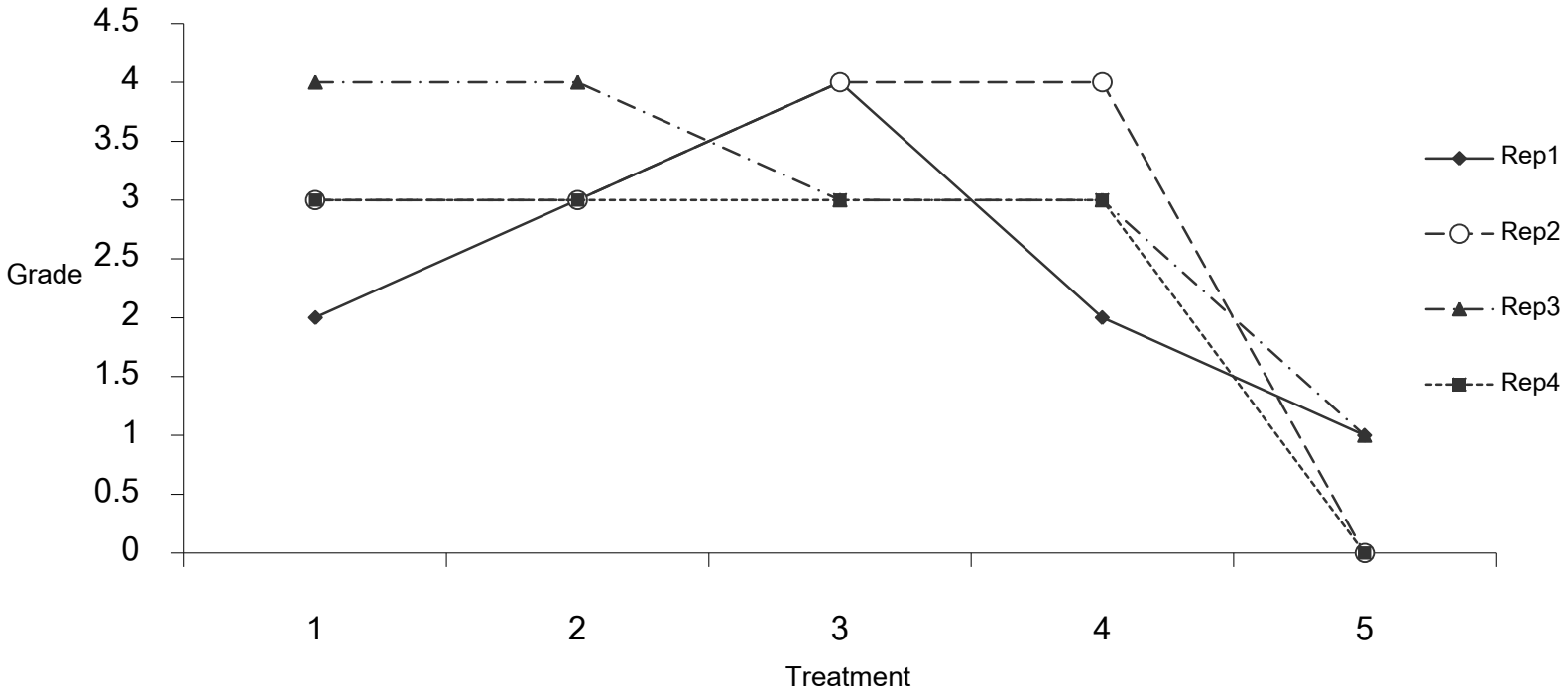
ระดับ 4 ต้นคะน้าไม่มีใบถูกทำลายโดยหนอนใยผัก



รูปที่ 1 จำนวนหนอนใยผัก(สุ่มนับจากคะน้า 30ต้นต่อซ้ำ)ก่อนการทดลองพ่นสารสลับ ทำการทดลองที่สวนเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง นนทบุรี ปี 2546



รูปที่ 2 ผลผลิตคะน้าหลังการทดลองบริหารความต้านทาน ที่สวนเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง นนทบุรี ปี 2546



รูปที่ 3 คุณภาพผลผลิตคะน้า หลังการทดลองบริหารความต้านทานกรรมวิธีต่างๆ ทดลองที่สวนเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง นนทบุรี ปี 2546

การป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน

Integrated Pest Control on Common Cabbage

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ศรีสุดา โท้ทอง[4/] กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์[4/]
อรพรรณ วิเศษสังข์[1/] จักรพงศ์ พิริยพล สัจจะ ประสงค์ทรัพย์[4/] ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์[4/]
วัชรี สมสุข อุทัย เกตุนุติ ไพศาล รัตนเสถียร อัจฉรา ตันติโชดก
ธีรพล อุ่นจิตวรรธนะ[3/] จุมพล สาระนาค[1/] เสริมศิริ คงแสงดาว[2/] พนิดา ไชยยันต์บูรณ์[3/]
กลุ่มกีฏและสัตว์วิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน ดำเนินการในแปลงเกษตรกร 2 ราย เปรียบเทียบการทดสอบวิธีผสมผสานกับวิธีการของเกษตรกร ที่ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ระหว่างเดือนธันวาคม 2545 - เมษายน 2546 โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและจำนวนศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ ชนิดของสารกำจัดศัตรูพืชและอัตราการใช้ น้ำหนักและราคาผลผลิต ต้นทุนการผลิต ตลอดจนพิษตกค้างในผลผลิต โดยวิธีผสมผสานมีการใช้วิธีการต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย การใช้ระดับเศรษฐกิจ กับดักกาวเหนียวสีเหลือง เชื้อจุลินทรีย์ และสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยการแช่เมล็ดในน้ำอุ่น 50 องศาเซลเซียส คลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดโรคพืชก่อนปลูกและพ่น Ca + Bo ตั้งแต่กะหล่ำปลีอายุ 2 สัปดาห์ ทุก 7 วัน รวมทั้งป้องกันกำจัดวัชพืชโดยการใช้สารกำจัดวัชพืช เปรียบเทียบวิธีการดังกล่าวกับวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชตามวิธีการของเกษตรกร

จากการตรวจนับแมลงศัตรูพืชโดยการสุ่มแบบซีเควนเชียล ทุก 3 - 7 วัน รวม 15 ครั้งในการทดสอบแบบวิธีผสมผสานพบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิด ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนคืบกะหล่ำ โดยพบแมลงศัตรูกะหล่ำ 3 ชนิด สูงเกินระดับเศรษฐกิจ ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนเจาะยอดกะหล่ำปลี จำนวน 7, 3 และ 1 ครั้ง ตามลำดับ หนอนใยผัก และหนอนคืบกะหล่ำพบต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจตลอดฤดูปลูก ทำการพ่นเชื้อ จุลินทรีย์ 1 ชนิด คือ Bt. (Florbac FC) และสารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ tebufenozide, chlorfenapyr และ

ทะเบียนวิจัยเลขที่ 43 06 006 025

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [2/] กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/] สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร [4/] สถาบันวิจัยพืชสวน

protiofos รวมพ่น 6 ครั้ง ด้วยอัตราการพ่น 100 ลิตร/ไร่ ส่วนวิธีของเกษตรกรพ่นสารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ spinosad, chlorfenapyr และ profenofos จำนวน 10 ครั้ง ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 - 200 ลิตร/ไร่

ทดสอบการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชในแปลงวิธีผสมผสานและวิธีเกษตกรพบมีการใช้สารฆ่าแมลงที่ระดับความเป็นพิษน้อย (III) -พิษปานกลาง (II) ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช

การป้องกันกำจัดวัชพืชในวิธีผสมผสานพบวัชพืชที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ ผักเบี้ยหิน แห้วหมู และต้นข้าว ทำการพ่นสาร 1 ครั้งด้วย คลีโทดีม หลังปลูก 3 สัปดาห์ ด้วยอัตราการพ่นสาร 50 ลิตร/ไร่ ส่วนวิธีของเกษตรกรพ่นสารกำจัดวัชพืช quizalofop-p-tefuryl หลังปลูกพืช 2 และ 5 สัปดาห์ ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่

การป้องกันกำจัดโรคพืชในวิธีผสมผสานพบโรคพืชที่สำคัญ ได้แก่ โรคเน่าเละ ทำการพ่น Ca + Bo จำนวน 6 ครั้ง เพื่อป้องกันกำจัดโรคเน่าเละ ส่วนวิธีเกษตรกรไม่ใช้สารกำจัดโรคพืช

จากการตรวจนับแมลงศัตรูธรรมชาติในวิธีผสมผสานพบแตนเบียนหนอนของหนอนใยผัก ชนิด *Cotesia plutellae* พบบนพืช 6.44 เปอร์เซ็นต์ วิธีของเกษตรกรพบแตนเบียน *Cotesia plutellae* 14.25 เปอร์เซ็นต์ บนกับดักกาวเหนียวสีเหลืองในแปลงวิธีผสมผสานพบแตนเบียนหนอนและแมลงวันก้นขน 0.07 และ 0.34 ตัว/กับดัก

การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชพบว่าวิธีผสมผสานสามารถลดปริมาณการใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืชลงได้ 43.18 เปอร์เซ็นต์ ได้น้ำหนักหัวดีที่มีคุณภาพ เพิ่มขึ้น 73.56 เปอร์เซ็นต์ และราคาเพิ่มขึ้น 55.28 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.05 ส่วนวิธีการของเกษตรกรได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 1.10 ไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในผลผลิตทั้งวิธีผสมผสานและวิธีการของเกษตรกร

สำหรับการทดสอบวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีในวิธีผสมผสาน สามารถแนะนำและถ่ายถอดได้

คำนำ

กะหล่ำปลี Common Cabbage เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่ปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ พื้นที่ปลูกในปี 2539-2540 พบมีพื้นที่ปลูก 56,018 ไร่ แหล่งผลิตที่สำคัญ คือ เชียงใหม่ น่าน แม่ฮ่องสอน เชียงราย มหาสารคาม ลำพูน เพชรบูรณ์ ตาก และเพชรบุรี เป็นต้น(กรมส่งเสริมการเกษตร,2542) ปัญหาการผลิตที่สำคัญที่ทำให้ผลผลิตสูญเสียคุณภาพ ได้แก่ศัตรูพืช เช่น แมลงศัตรูพืช โรคพืช และวัชพืช รวมทั้งพิษตกค้างในผลผลิต แต่ปัญหาดังกล่าวพบว่าแมลงศัตรูพืชเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากแมลงศัตรูบางชนิดได้มีการพัฒนาต้านทานต่อสารฆ่าแมลงหลายชนิดทำให้มีการพ่นบ่อยครั้ง ด้วยอัตราความเข้มข้นสูง หรือพ่นด้วยสารฆ่าแมลงที่มีพิษร้ายแรงยิ่ง แมลงศัตรูดังกล่าวได้แก่ หนอนใยผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ หนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก เป็นต้น โรคพืชที่สำคัญ ได้แก่ โรคเน่าเละ ส่วนวัชพืชที่สำคัญ ได้แก่ ผักเบี้ยหิน ผักโขมหนาม หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด และหญ้าตีนนก เพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำวิธีการบางวิธีที่ให้ผลดี เช่น การใช้ระดับเศรษฐกิจ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ การใช้กับดักกาวเหนียวสีเหลือง การใช้สารกำจัดศัตรูพืช การใช้น้ำอุ่นแช่เมล็ดก่อนปลูก การคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดโรคพืชก่อนปลูก และการใช้ธาตุอาหารCa + Bo เป็นต้น ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ได้ผ่านการค้นคว้าวิจัยมาแล้ว และได้ทำการทดสอบในปี 2545 พบว่าวิธีผสมผสานให้ผลตอบแทนต่อการลงทุน3.44 - 3.63 มากกว่าวิธีเกษตรกรได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 2.91-3.09 (ปิยรัตน์ และคณะ 2545) เพื่อยืนยันผลการทดสอบ จึงทำการทดสอบซ้ำในปี 2546 สำหรับนำมาใช้ถ่ายทอดและแนะต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ Speed 047
- เชื้อจุลินทรีย์ Bt.(Florbac FC)
- สารฆ่าแมลง chlorfenapyr (Rampage 10%EC)
  tebufenozide (Mimic 20% F) และ protiofos(Protiofos 50% EC)
- สารกำจัดโรคพืช metalaxyl (Apron 35% SD) iproione (Rovral 50% WP)
- สารกำจัดวัชพืช คลีโทดีม (ซีเล็คท์ ซุปเปอร์ 12% EC)
- กาวเหนียวคินริว
- กับดักสีเหลือง (กระป๋องน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วขนาด 1 ลิตร)
- สารจับใบ Foil
- ปุ๋ยสูตร 25-7-7 , 16-16-16
- ธาตุอาหารรอง Ca + Bo (Beplus)
- เครื่องยนต์พ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ
- เครื่องตรวจวิเคราะห์วัตถุมีพิษ Gas Liquid Chromotographic ที่มีหัวตรวจ ECD, NPD และ FPD

วิธีการ

ทำการทดสอบในแปลงกะหล่ำปลีขนาด 1 ไร่ จากเกษตรกร 2 ราย เป็นแปลงผสมผสาน 1 ราย และแปลงเปรียบเทียบวิธีของเกษตรกร 1 ราย ซึ่งมีวิธีดำเนินการดังนี้

<u>วิธีผสมผสาน</u>

การเตรียมกล้า

เตรียมแปลงเพาะกล้ากะหล่ำปลีขนาด 2x10 เมตร จำนวน 2 แปลง ทำการแช่เมล็ดกะหล่ำปลีพันธุ์ speed 047 (ตราเครื่องบิน) ด้วยน้ำอุ่น 50 ^{0}C นาน 20 นาที แล้วคลุกเมล็ดด้วย metalaxyl (Apron 35 % SD) และ iprodione (Rovral 50% WP) อัตรา 10 กรัม/เมล็ด 1 กก. โดยใช้เมล็ด 100 กรัมต่อพื้นที่ 1 ไร่ หว่านเมล็ดลงในแปลงเพาะ กลบเมล็ดแล้วคลุมด้วยฟาง

แปลงทดสอบวิธีผสมผสาน

- เตรียมแปลงทดสอบจำนวน 1 แปลง ขนาด 1 ไร่ โดยการไถคราด 2 ครั้ง ตากดินไว้ 7 วัน หลังจากนั้นพ่นสารกำจัดวัชพืช คลีโทดีม อัตรา 150 มล./ไร่ หลังปลูก 3 สัปดาห์

- เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 30 วัน ย้ายลงแปลงปลูก ระยะปลูก 40x40 ซม. หลังจากนั้นทำการติดตั้งกับดักกาวเหนียวสีเหลือง อัตรา 80 กับดัก/ไร่ (ระยะ 4x5 เมตร) โดยให้กับดักสูงจากพื้นดิน 30 ซม. ทากาวเหนียวใหม่ทุก 2 สัปดาห์

- ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 25-7-7 หลังปลูก 14 วันอัตรา 100 กก./ไร่ และ 16-16-16 หลังปลูก 30 วัน อัตรา 100 กก./ไร่ รวมใช้จำนวน 2 ครั้ง

- หลังปลูกพืช 2 วัน เริ่มสำรวจแมลงศัตรูกะหล่ำ ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนคืบกะหล่ำปลี โดยการสุ่มแบบซีเควนเชียล ทุก 3 - 7 วัน ดังตารางสำรวจ ทำการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ Bt. (Florbac FC) อัตรา 250 มล./ไร่ chlorfenapyr 100 มล./ไร่ หรือ tebufenozide 100 มล./ไร่ หรือ prothiofos 200 มล./ไร่ เมื่อแมลงศัตรูสูงเกินระดับเศรษฐกิจ และในช่วงก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต 2 สัปดาห์ ให้ใช้เฉพาะเชื้อ Bt.

ตารางสำรวจปริมาณหนอนใยผักแบบซีเควนเชียลในกะหล่ำปลี (Winai et al, 1995)

จำนวนหนอนใยผัก (ระยะก่อนเข้าปลี)[1/]						
จำนวนต้น	จำนวนไข่			จำนวนหนอน		
	ระดับต่ำ	ระดับสูง	ET	ระดับต่ำ	ระดับสูง	ET
1 – 10	25	68	6.8	10	27	2.7
1 – 15	50	103	6.9	20	41	2.7
1 – 20	78	138	6.9	31	55	2.8
1 – 25	105	175	7.0	42	70	2.8
1 – 30	135	210	7.0	54	84	2.8

[1/] อายุพืช (1 – 30 วัน)

จำนวนหนอนใยผัก (ระยะเข้าปลี) [2/]						
จำนวนต้น	จำนวนไข่			จำนวนหนอน		
	ระดับต่ำ	ระดับสูง	ET	ระดับต่ำ	ระดับสูง	ET
1 – 5	5	63	12.6	2	25	5.0
1 – 10	50	133	13.3	20	53	5.3
1 – 15	105	205	13.7	42	82	5.5
1 – 20	160	278	13.9	64	111	5.6

[2/] อายุพืช (31 – 60 วัน)

หมายเหตุ

1. เมื่อพบจำนวนไข่หรือหนอนใยผักต่ำกว่าจำนวนในระดับต่ำ ของแต่ละช่วงจำนวนต้นที่ตรวจนับ ไม่ต้องพ่นสารฆ่าแมลง
2. หากพบจำนวนไข่หรือหนอนใยผักสูงกว่าระดับสูงของแต่ละช่วงจำนวนต้นที่ตรวจนับ ให้พ่น สารฆ่าแมลง
3. หากจำนวนไข่หรือหนอนใยผักอยู่ระหว่างระดับต่ำและระดับสูง ให้เพิ่มจำนวนต้นที่ตรวจนับ
4. หากพบหนอนคืบกะหล่ำ หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม ให้คิดเป็นจำนวนหนอนใยดังนี้

หนอนคืบกะหล่ำ 1 ตัว=หนอนใย 20 ตัว

หนอนกระทู้ผัก 1 ตัว=หนอนใย 20 ตัว

หนอนกระทู้หอม 1 ตัว=หนอนใย20 ตัว

- ทำการสำรวจด้วงหมัดผักและหนอนเจาะยอดกะหล่ำ จากกะหล่ำปลี 50 ต้น/ไร่ ในกรณีที่พบการระบาดของด้วงหมัดผักสูงเกิน 1 ตัว/ต้น(อายุพืช 1 – 15 วัน) และสูงเกิน 10 ตัว/ต้น (อายุพืช มากกว่า 15 วัน) ทำการพ่นสารฆ่าแมลง fipronil อัตรา 300 มล./ไร่ หรือ profenofos อัตรา 200 มล./ไร่ อย่างใดอย่างหนึ่ง โดยพ่นสลับและหากพบการทำลายของหนอนเจาะยอดกะหล่ำ พ่นด้วย prothiofos อัตรา 200 มล./ไร่

- เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ พ่นด้วย Ca+Bo จำนวน 6 ครั้ง ทุก 7 วัน เพื่อลดการระบาดของโรคเน่าเละ

- การพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ใช้เครื่องยนต์พ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ (ลากสาย) (Power pump sprayer) ใช้หัวฉีดแบบกรวยปรับได้ (adjestable cone nozzle) มีรูฉีดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ใช้อัตราการพ่นประมาณ 100 ลิตร/ไร่

- ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืช โดยเก็บตัวอย่างกะหล่ำปลีทั่วแปลงในช่วงระยะเก็บเกี่ยว ดังนี้

1. ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงที่ใช้ทั้งในวิธีผสมผสาน ได้แก่ tebufenozide, chlorfenapyr, และ prothiofos

2. ตรวจหาปริมาณสารพิษกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ กลุ่มออร์กาโนคลอรีน (BHC, heptachlor, aldrin, dicofol, dieldrin, endrin, endosulfan และ DDT) กลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส (DDVP, mevinphos, diazinon, fenitrothion, triazophos, monocrotophos, malathion, parathion, dimethoate) กลุ่มไพรีทรอยด์ (permethrin, cyhalothrin, fenvalerate และ deltamethrin) และกลุ่มคาร์บาเมท (methomyl, carbofuran, metalaxyl, carbaryl)

<u>วิธีเกษตรกร</u>

- ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 25-7-7 หลังปลูก 15 วัน อัตรา 100 กก./ไร่ และ 16-16-16 ใส่หลังปลูก 40 วัน อัตรา 100 กก./ไร่

- เริ่มพ่นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชหลังปลูก 7 วัน และพ่นติดต่อกันทุก 4 - 7 วัน ด้วยสาร 3 ชนิด คือ chlorfenapyr , spinosad , profenofos อัตรา 75, 75, 200 และ 100 มล./ไร่

- พ่นสารกำจัดวัชพืช quizalofop-p-tefuryl อัตรา 100 มล./ไร่ หลังปลูกพืช 13 และ 35 วัน ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกชนิดและจำนวนประชากรของแมลงศัตรูพืชและแตนเบียนศัตรูธรรมชาติบนพืชและบนกับดักกาวเหนียวสีเหลือง ชนิดวัชพืชและชนิดโรคพืช บันทึกชนิดของสารกำจัดศัตรูพืชและอัตราการใช้ บันทึกจำนวนหัวดีและหัวเสีย เนื่องจากการทำลายของแมลงและโรคพืช น้ำหนักและราคาผลผลิต ต้นทุนการผลิตและปริมาณสารพิษตกค้างในผลผลิต ทั้งในวิธีผสมผสานและวิธีเกษตรกร

เวลาและสถานที่

เวลา ธันวาคม 2545 - เมษายน 2546

สถานที่ แปลงเกษตรกรตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี 2 ราย

- แปลงคุณประสิทธิ์ พับแผ่นทอง (วิธีผสมผสานขนาด 1 ไร่)

แปลงคุณมงคล ปั้นทอง (วิธีเกษตรกรขนาด 1 ไร่)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการตรวจนับศัตรูพืชในแปลงวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกร พบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิด ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนคืบกะหล่ำ พบโรคพืชคือ โรคเน่าเละ และพบวัชพืช 3 ชนิด คือ ผักเบี้ยหิน แห้วหมู และข้าว (ตารางที่ 1)

ในวิธีผสมผสานพบแมลงศัตรูกะหล่ำปลีสูงเกินระดับเศรษฐกิจ คือ หนอนเจาะยอดกะหล่ำพบ 1 ครั้ง 0.08 ตัว/ต้น หนอนกระทู้ผัก 7 ครั้ง ระหว่าง 0.80-5.48 ตัว/ต้น หนอนกระทู้หอม 3 ครั้ง ระหว่าง 0.32 - 1.85 ตัว/ต้น ส่วนหนอนใยผักและหนอนคืบกะหล่ำพบต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจตลอดการทดสอบ ส่วนวิธีของเกษตรกร พบหนอนกระทู้ผัก 2 ครั้ง ระหว่าง 0.20 – 0.30 ตัว/ต้น หนอนกระทู้หอม 1 ครั้ง 0.20 ตัว/ต้น หนอนคืบกะหล่ำ 1 ครั้ง 0.20 ตัว/ต้น ส่วนหนอนใยผัก และหนอนเจาะยอดกะหล่ำพบต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจตลอดการทดลอง (ตารางที่ 2)

ศัตรูธรรมชาติในวิธีผสมผสานพบ 1 ชนิด เป็นแตนเบียนหนอนใยผักชนิด *Cotesia plutellae* พบ 6.44 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธีเกษตรกรพบ 1 ชนิด คือ *Coteasia plutellae* พบ 14.25 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ส่วนตัวเต็มวัยของแตนเบียนหนอนบนกับดักกาวเหนียวสีเหลือง พบเฉลี่ย 0.07 ตัว/กับดัก ขณะที่ตัวเต็มวัยหนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก และหนอนกระทู้หอม พบ 7.20, 0.01 และ 0.04 ตัว/กับดัก ตามลำดับ (ตารางที่ 4) จะเห็นได้ว่าศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูกะหล่ำที่ติดบนกับดัก พบในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับแมลงศัตรูพืช

จำนวนชนิดและอัตราการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีในแปลงวิธีผสมผสาน มีการใช้สารฆ่าแมลง 3 ชนิด คือ tebufenozide, chlorfenapyr และ prothiofos เชื้อจุลินทรีย์ 1 ชนิด คือ Bt. (Florbac FC.) โดยใช้อัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่ ใช้สารกำจัดโรคพืช 2 ชนิด คือ metalaxyl และ iprodione คลุกเมล็ดก่อนปลูก, และสารกำจัดวัชพืช 1 ชนิด คือ คลีโทดีม หลังปลูก 3 สัปดาห์ เพื่อคลุมวัชพืช ได้แก่ ผักเบี้ยหิน แห้วหมู และ ลูกข้าว ด้วยอัตราการใช้สาร 50 ลิตร/ ไร่ (ตารางที่ 5) รวมใช้สารกำจัดศัตรูพืช 7 ชนิด จำนวน 8 ครั้ง (ตารางที่ 6) คือพ่นสารกำจัดแมลงศัตรูพืช 6 ครั้ง สารกำจัดโรคพืชสำหรับคลุกเมล็ด 1 ครั้ง และสารกำจัดวัชพืช 1 ครั้ง

ส่วนวิธีการของเกษตรกร มีการใช้สารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ spinosad, chlorfenapyr และ profenofos อัตรา 135 ลิตร/ไร่ สารกำจัดโรคพืช 1 ชนิดคือ metalaxyl สำหรับคลุกเมล็ด สารกำจัดวัชพืช 1 ชนิดคือ quizalofop-p-tefuryl ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่ (ตารางที่ 5) รวมใช้สารกำจัดศัตรูพืช 5 ชนิด จำนวน 13 ครั้ง (ตารางที่ 6) คือพ่นสารฆ่าแมลง 10 ครั้ง สารกำจัดโรคพืช สำหรับคลุกเมล็ด 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดวัชพืช 2 ครั้ง (ตารางที่ 6) พบว่าวิธีผสมผสานลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงลงได้ 43.18 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชที่นำมาทดสอบเป็นสารที่พิษน้อย (III) 1 ชนิด และพิษปานกลาง (II) 2 ชนิด ส่วนวิธีของเกษตรกรมีการใช้ สารทีมีพิษน้อย (III) ถึงพิษปานกลาง (Ib) (ตารางที่ 7 และภาคผนวก) จากการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างโดยกองวัตถุมีพิษทางการเกษตรพบว่า ในวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกรไม่พบสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลง (ตารางที่ 7)

เปรียบเทียบน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ (ตารางที่ 8) พบว่าวิธีผสมผสานในแปลงที่ได้น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด 6,930.88 กก./ไร่ เป็นน้ำหนักได้คุณภาพ 6,274.88 กก./ไร่ น้ำหนักหัวเสีย 96 กก./ไร่ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหัวเสีย 1.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับวิธีของเกษตรกร ได้น้ำหนักผลผลิตต่อไร่ทั้งหมด 4,543.36 กก./ไร่ เป็นน้ำหนักได้คุณภาพ 3,615.36 กก./ไร่ เมื่อพิจารณาจำนวนผลผลิตต่อไร่ในวิธีผสมผสานพบว่า ได้จำนวนหัวที่มีคุณภาพ 10,976.00 หัว และหัวเสียเนื่องจากหนอนเจาะยอดกะหล่ำ 128 หัว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนหัวเสียทั้งหมด 10.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนวิธีของเกษตรได้น้ำหนักหัวที่มีคุณภาพคือ 7,648 หัว

เปรียบเทียบต้นทุนการผลผลิตต่อไร่ พบว่าวิธีผสมผสานเสียค่าใช้จ่ายเป็นเงิน 8,779.70 บาท เมื่อหักต้นทุนในการผลิตแล้วได้กำไรสุทธิ 17,999.82 บาท และได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.05 ตามลำดับ ส่วนวิธีของเกษตรกร เสียค่าใช้จ่ายที่เป็นต้นทุนการผลิตเป็นเงิน 15,692.40 บาท เมื่อหักต้นทุนในการผลิตแล้วได้กำไร 1,553.04 บาท ได้รับผลตอบแทนต่อการลงทุน 1.10 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน เปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกร จังหวัดเพชรบุรี จำนวน 2 ราย ระหว่างเดือนธันวาคม 2545 - เมษายน 2546 พบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิด ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนคืบกะหล่ำ พบโรคพืช 1 ชนิด คือ โรคเน่าเละ และวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ ผักเบี้ยหิน แห้วหมู และข้าว ในวิธีผสมผสานพบการใช้สารกำจัดศัตรูพืชจำนวน 7 ชนิด 8 ครั้ง ด้วยสารที่มีระดับความเป็นพิษน้อย (III) - พิษปานกลาง (II) ส่วนวิธีการของเกษตรกรใช้สารกำจัดศัตรูพืชจำนวน 5 ชนิด 13 ครั้ง ด้วยสารที่มีระดับความเป็นพิษน้อย (III) - พิษปานกลาง (II) ในวิธีผสมผสานพบแตนเบียน 1 ชนิด คือ *Cotesia plutellae* 6.44 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นแตนเบียนหนอนของหนอนใยผัก ส่วนวิธีของเกษตรกรพบแตนเบียน 1 ชนิด คือ *Cotesia plutellae* 14.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าวิธีผสมผสานสามารถลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงลงได้ 43.18 เปอร์เซ็นต์ เสียค่าใช้จ่ายที่เป็นต้นทุนการผลิต 8,779.70 บาท/ไร่ ได้น้ำหนักหัวที่มีคุณภาพ 6,274.88 กก./ไร่ เป็นเงิน 25,099.52 บาท/ไร่ ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.05 ส่วนวิธีเกษตรกรได้น้ำหนักหัวที่มีคุณภาพ 3,615.36 กก./ไร่ เป็นเงิน 14,461.44 บาท/ไร่ ผลตอบแทนต่อการลงทุน 1.10 ไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลง ทั้งวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกรทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ คุณจาตุรงค์ ฤกษ์สังเกตุ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช คุณศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย คุณสมรวย รวมชัยอภิกุล คุณสุมณฑา ธีระชีพ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ ที่ช่วยรวบรวมข้อมูล คุณนงลักษณ์ ขันตี และนายสุนทร บุญพิทักษ์ ที่ช่วยพิมพ์ผลงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542 . คำแนะนำที่ 165 เรื่องการปลูกกะหล่ำปลี. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ. 19 หน้า

Winai, P., P. Keinmeesuke, A. Vattanatangum and T. Saito. 1995. Forecasting and partial control by yellow sticky trap in the diamondback moth *In* : Management of Brown Planthopper and Resistance of Diamondback Moth, Nagoya, Japan, pp. 107 - 119.

พิมลพร นันทะ ปิยรัตน์ เขียนมีสุข ไพศาล รัตนเสถียร นงพร กิจบำรุง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น สัจจะ ประสงค์ทรัพย์ กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ จักรพงศ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง ลัดดาวัลย์ อินทรสังข์ อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก วัชรี สมสุข เสริมศิริ คงแสงดาว- จุมพล สาระนาค อรพรรณ วิเศษสังข์ พนิดา ไชยยันต์บูรณ์ จินตนา ภู่มงกุฎชัย ธีรพล อุ่นจิตวรรธนะ สุปราณี อิ่มพิทักษ์ จรัส กิจบำรุง พินิจ เกตุทอง ประหยัด ยุพิน. 2545. การทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำปลีโดยวิธีผสมผสาน. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ตารางที่ 1 ชนิดของศัตรูที่สำคัญบนกะหล่ำปลี และแมลงศัตรูธรรมชาติในวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ธันวาคม - มีนาคม ปี 2546

ชนิดศัตรูพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	แมลงศัตรูธรรมชาติ
<u>แมลงศัตรูพืช</u>		
1. หนอนใยผัก (Diamondback moth)	*Plutella xylostella* (Linnaeus)	แตนเบียนหนอน *Cotesia plutellae*
2. หนอนเจาะยอดกะหล่ำ (Cabbge webworm)	*Hellula undalis* (Fabricius)	
3. หนอนกระทู้ผัก (Common cutworm)	*Spodoptera litura* (Fabricius)	แตนเบียนหนอน *Microplitis manilae*
4. หนอนกระทู้หอม (Beet army worm)	*Spodoptera exigua* (Hubner)	แตนเบียนหนอน *Microplitis manilae*
5. หนอนคืบกะหล่ำ (Cabbage looper)	*Trichaplusia* ni (Hubner)	
<u>โรคพืช</u>		
1. โรคเน่าเละ (Soft rot)	*Erwinis carotovora* var. carotovara	
<u>วัชพืช</u>		
1. ผักเบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrum* Linn.	
2. แห้วหมู	Cyperus rotundus Linn.	
3. ข้าว	*Oryza sativa* Linn.	

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนประชากรแมลงศัตรูกะหล่ำปลีที่พบในวิธีผสมผสานและวิธีเกษตรกรที่ ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี กุมภาพันธ์ – มีนาคม 2546

วันที่	อายุพืชหลังปลูก (วัน)	วิธีผสมผสาน						อายุพืชหลังปลูก (วัน)	เกษตรกร					
		หนอนใยผัก		หนอนเจาะยอด	หนอนกระทู้ผัก	หนอนกระทู้หอม	หนอนคืบกะหล่ำ		หนอนใยผัก		หนอนเจาะยอด	หนอนกระทู้ผัก	หนอนกระทู้หอม	หนอนคืบกะหล่ำ
		ไข่	หนอน						ไข่	หนอน				
5 ก.พ.	2	0.85	0.80	0	0	0	0	ยังไม่ได้ปลูก						
10 ก.พ.	7	0.20	0.45	0	0.05	0	0.05	4	1.10	0.30	0	0	0	0
13 ก.พ.	10	0.10	1.97	0	1.92*	0.32*	0.02	7	0.33	1.07	0	0	0	0
20 ก.พ.	17	0	0.45	0	0.30*	0.05	0	14	1.97	2.37	0	0.30*	0	0
24 ก.พ.	21	0.10	0.90	0	0.18*	0.03	0.05	18	0.10	0.70	0	0	0	0
27 ก.พ.	24	0	2.01	0	0.07	0.07	0.02	21	0	3.10	0	0	0	0
3 มี.ค.	28	0.70	1.50	0	0.05	0.03	0.03	25	0.20	2.50	0	0	0	0.20*
6 มี.ค.	31	0.35	1.35	0	2.08*	0.03	0.08	28	0.20	0.50	0	0.20*	0.20*	0
10 มี.ค.	35	0.05	1.60	0.08*	5.48*	1.85*	0.13	32	1.40	1.20	0	0	0	0.10
13 มี.ค.	38	0	5.25	0	2.93*	0.68*	0	35	0	1.30	0	0	0	0
17 มี.ค.	42	2.05	3.18	0	0.80*	0.25	0	39	1.05	4.15	0	0.10	0	0.10
20 มี.ค.	45	0.65	1.40	0	0.10	0.25	0	42	0	2.33	0	0	0	0.05
24 มี.ค.	49	3.27	1.90	0	0.10	0.08	0	46	1.50	1.75	0	0	0	0.05
27 มี.ค.	52	0.50	2.50	0	0	0	0	49	0	0.70	0	0	0	0
31 มี.ค.	56	0.10	1.10	0	0	0.03	0	53	3.73	1.07	0	0.05	0	0.05

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียนหนอนใยผักบนต้นกะหล่ำปลี ในวิธีผสมผสานและ วิธีเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

เปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียนศัตรูกะหล่ำปลี			
อายุพืชหลังปลูก (วัน)	วิธีผสมผสาน	อายุพืชหลังปลูก (วัน)	วิธีเกษตรกร
	LP1		LP1
2	0	ยังไม่ได้ปลูก	
7	0	4	25.00
10	1.66	7	0
17	0	14	2.74
21	0	18	30.00
24	15.97	21	9.38
28	7.70	25	5.66
31	12.90	28	37.50
35	11.11	32	7.69
38	2.77	35	7.14
42	5.22	39	4.59
45	6.67	42	16.67
49	14.93	46	23.91
52	5.66	49	0
56	12.00	53	29.17

LP1 - แตนเบียนหนอนของหนอนใยชนิด *Cotesia plutellae*

ตารางที่ 4 จำนวนประชากรหนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก และแตนเบียนหนอนใยผักบนกับดักกาวเหนียวสีเหลือง ในวิธีผสมผสาน ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

วันที่	อายุพืช (วัน)	วิธีผสมผสาน				
		ตัวเต็มวัยของแมลงศัตรูกะหล่ำปลี			ศัตรูธรรมชาติ	
		หนอนใยผัก	ด้วงหมัดผัก	หนอนกระทู้หอม	แตนเบียนหนอน [1/]	แมลงวันก้นขน
13 ก.พ.	10	2.55	0	0	0	0
20 ก.พ.	17	0.95	0	0	0.02	0
27 ก.พ.	24	1.15	0	0.10	0.10	0.40
6 มี.ค.	31	1.95	0	0	0.25	0.25
13 มี.ค.	38	4.40	0.10	0.10	0	0.70
20 มี.ค.	45	8.20	0	0.05	0.05	0.70
27 มี.ค.	52	31.20	0	0	0.10	0.30
เฉลี่ย		**7.20**	**0.01**	**0.04**	**0.07**	**0.34**

[1/] แตนเบียนหนอน *Cotesia plutellae*

ตารางที่ 5 ชนิดและอัตราของสารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชระหว่างวิจัยผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

ชนิดของสารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช / อัตราการใช้	
วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
สารฆ่าแมลง (มล./น้ำ 100 ลิตร / ไร่)	สารฆ่าแมลง (มล./น้ำ 135 ลิตร / ไร่)
- tebufenozide 20% F/ 100	- chlorfenapyr 10%SC/90
- chlorfenapyr 10% EC/ 100	- spinosad 12%SC/87
- prothiofos 50% EC/ 200	- profenofos 50% EC/ 175
เชื้อจุลินทรีย์ (มล./น้ำ 100 ลิตร/ไร่)	เชื้อจุลินทรีย์ (มล./น้ำ 100 ลิตร/ไร่)
- Bt. (Forbac FC)/ 250	-
สารกำจัดโรคพืช	สารกำจัดโรคพืช
- metalaxyl* 35% SD	- metalaxyl 35 * 35% SD
- iprodione* 50% WP	
(10 กรัม/เมล็ด 1 กก.)	
สารกำจัดวัชพืช (มล./น้ำ 50 ลิตร/ไร่)	สารกำจัดวัชพืช (มล./น้ำ 100 ลิตร/ไร่)
- คลีโทดีม 12% EC / 150	quizalofop-p-tefuryl 6% EC/250
กาวเหนียว (มล./ 80 กับดัก/ ไร่)	
- คินริว / 400	
ปุ๋ยเคมี (กก./ ไร่ / ครั้ง)	ปุ๋ยเคมี (กก./ ไร่ / ครั้ง)
- 25–7–7/100	- 25–7–7/100
- 16-16-16/100	- 16-16-16/100
- Ca + Bo/ 100	

ตารางที่ 6 ชนิดและจำนวนครั้งของการใช้สารกำจัดศัตรูพืชระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

ชนิดและจำนวนครั้งในการใช้สารกำจัดศัตรูพืช (ชนิด/ครั้ง)	
วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
สารฆ่าแมลง	สารฆ่าแมลง
- tebufenozide /1	- spinosad / 1
- chlorfenapyr /1	- spinosad + chlorfenapyr / 5
- chlorfenapyr + prothiofos /1	- spinosad + chlorfenapyr + profenofos / 4
เชื้อจุลินทรีย์	เชื้อจุลินทรีย์
- Bt. (Forbac F.C)/ 3	-
รวม 4 ชนิด 6 ครั้ง	**รวม 3 ชนิด 10 ครั้ง**
สารกำจัดโรคพืช	สารกำจัดโรคพืช
- metalaxyl + iprodione */1	- metalaxyl 35* /1
รวม คลุกเมล็ดก่อนปลูก 2 ชนิด / 1 ครั้ง	**1 ชนิด / 1 ครั้ง**
สารกำจัดวัชพืช	สารกำจัดวัชพืช
- คลีโทดีม /1	- quizalofop-p-tefuryl / 2
รวม 1 ชนิด / 1 ครั้ง	**1 ชนิด / 2 ครั้ง**
รวม 7 ชนิด 8 ครั้ง	**รวม 5 ชนิด 13 ครั้ง**

* คลุกเมล็ดก่อนปลูก

ตารางที่ 7 อัตราการพ่นสารต่อไร่ จำนวนครั้ง ในการพ่นสารและเปอร์เซ็นต์ลดการใช้สารระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
1. ปริมาณสารกำจัดแมลง (ลิตร,กก./ไร่)	1.25	2.20
ลดปริมาณการใช้สารลงได้ (%)	43.18	-
2.จำนวนพ่นสาร (ครั้ง)	7	12
ลดจำนวนครั้งในการพ่นสาร (%)	41.66	-
3.น้ำหนักผลผลิตที่ได้คุณภาพ/ไร่ (กก.)	6,274.88	3,615.36
ได้น้ำหนักผลผลิตเพิ่มขึ้น (%)	73.56	-
4.ราคาผลผลิต/ไร่	26,779.52	17,245.44
ได้ราคาผลผลิตเพิ่มขึ้น (%)	55.28	-
5. ระดับความเป็นพิษ (WHO)		
ชนิดมีพิษร้ายแรงมาก (Ia)	0	0
ชนิดมีพิษร้ายแรง (Ib)	0	0
ชนิดมีพิษปานกลาง (II)	2	1
ชนิดมีพิษน้อย (III)	1	2

ตารางที่ 8 น้ำหนักผลผลิต จำนวนผลผลิต และราคาผลผลิตต่อไร่ ในการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน กับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

	วิธีผสมผสาน	**วิธีเกษตรกร**
น้ำหนักผลผลิต (กก./ไร่)		
น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด	**6,930.88**	**4,543.36**
น้ำหนักผลผลิตที่ได้คุณภาพ	6,274.88	3,615.36
น้ำหนักผลผลิตที่ไม่ได้คุณภาพ (หัวขาว)	560.00	928.00
น้ำหนักหัวดี (กก./หัว)	0.57	0.47
น้ำหนักหัวเสียทั้งหมด	96.00	0
น้ำหนักหัวเสีย (%)	1.38	0
จำนวนหัว (หัว/ไร่)		
จำนวนหัวทั้งหมด	12,416.00	10,720.00
จำนวนผลผลิตที่ได้คุณภาพ	10,976.00	7,648.00
จำนวนผลผลิตที่ไม่ได้คุณภาพ (หัวขาว)	1,248.00	3,072.00
จำนวนหัวเสีย (โรคเน่าเละ)	64.00	0
จำนวนหัวเสีย (หนอนเจาะยอด)	128.00	0
จำนวนหัวเสีย (%)	10.83	0
ราคาผลผลิตทั้งหมด (บาท/ไร่)	**26,779.52**	**17,245.44**
ราคาผลผลิตที่ได้คุณภาพ[1/]	**25,099.52**	**14,461.44**
ราคาผลผลิตที่ไม่ได้คุณภาพ[2/]	**1,680.00**	**2,784.00**

[1/]ราคาผลผลิต คำนวณจากราคาผลผลิต 4 บาท/กก.

[2/]ราคาผลผลิต คำนวณจากราคาผลผลิต 3 บาท/กก.

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต รายได้สุทธิ ตลอดจนผลตอบแทนต่อการลงทุนระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

	วิธีผสมผสาน	**วิธีเกษตรกร**
ต้นทุนการผลิต (C) บาท/ไร่		
1. แปลงเพาะกล้า		
- ค่าเมล็ดพันธุ์ (Speed)	560.00	560.00
2. แปลงทดสอบ		
- ค่าเตรียมดิน	3,000.00	3,000.00
- ค่าปุ๋ย	1,980.00	1,980.00
- ค่าแรงใส่ปุ๋ย (100 บาท / ครั้ง)	200.00	200.00
- ธาตุอาหารรอง (Ca + Bo)	102.00	-
- ค่ากาวเหนียว[1/]	448.00	-
- ค่ากับดัก[2/]	40.00	-
- ค่าสารกำจัดโรคพืชและวัชพืช	207.20	145.40
- ค่าสารกำจัดแมลงศัตรูพืช	1,455.00	8,487.00
- ค่าสารจับใบ	87.50[3/]	120.00[4/]
- ค่าจ้างพ่นสารฆ่าแมลง (100 บาท / ครั้ง)	700.00	1,200.00
รวม (C)	**8,779.70**	**15,692.40**
ราคาผลผลิต (R) บาท/ไร่	26,779.52	17,245.44
รายได้สุทธิ (บาท/ไร่)	17,999.82	1,553.04
ผลตอบแทนต่อการลงทุน (R/C)	3.05	1.10

[1/] คำนวณจากราคากาวเหนียว 280 บาท/ลิตร (ใช้กาวเหนียว 4 ครั้ง ๆ ละ 400 ซีซี)

[2/] ราคากับดักกาวเหนียว 0.50 บาท/กับดัก

[3/] คำนวณจากราคาสารจับใบ 250 บาท/ลิตร (ใช้ 7 ครั้ง ๆ ละ 50 มล./ไร่)

[4/] คำนวณจากราคาสารจับใบ 200 บาท/ลิตร (ใช้ 12 ครั้ง ๆ ละ 50 มล./ไร่)

ภาคผนวก

ชนิดสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสารกำจัดวัชพืช	ระดับความเป็นพิษ WHO	ราคาจำหน่าย (บาท/ลิตร,กก.)
สารฆ่าแมลง		
chlorfenapyr (Rampage 10% SE)	II	3,800.00
spinosad (success 12% EC)	III	6,000.00
protiofos (Tokution 50% EC)	II	650.00
profenofos (ซานริครอน 50% EC)	lll	360.00
tebufenozide (Mimic 20% F)	lll	2,200.00
เชื้อจุลินทรีย์		
Bt. (Florbac FC.)		460.00
สารกำจัดโรคพืช		
metaraxyl (Metalaxyl 35% SD)		360.00
iprodione (Rovral 50% WP)	lll	860.00
สารกำจัดวัชพืช		
คลีโทดีม (ซีเล็คท์ ซุปเปอร์ 12% EC)		1,300.00
quizalofop-p- tefuryl (แคนนู 6% EC)		700.00
สารเคมีอื่น ๆ		
สารจับใบ (เนฟิล์ม)		200.00
สารจับใบ (Foil)		250.00
ปุ๋ยเคมี		(บาท/50กก.,ลิตร)
ปุ๋ยน้ำที่มีธาตุอาหาร Ca+Bo (B-plus)		170.00
ปุ๋ยเคมีสูตร 25-7-7		460.00
ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16		530.00

การทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน[1]

Integrated Pest Management for Cotton Insects

สุพจน์ กิตติบุญญา[2] เกศรา จีระจรรยา

สุเทพ สหายา ลักขณา บำรุงศรี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แปลงทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน ได้ดำเนินการที่ไร่ฝ้ายเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ในปี 2546 มีเกษตรกรร่วมทำแปลงทดสอบสาธิต 6 ราย พื้นที่ปลูกฝ้าย 89ไร่ แบ่งแปลงฝ้ายเกษตรกรออกเป็น 2 ส่วน คือแปลงทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสานรายละ 5 ไร่ จำนวน 30 ไร่ ส่วนที่เหลือเป็นแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรรายละ 5 – 20 ไร่ จำนวน 59 ไร่ เทคโนโลยีที่นำมาใช้ในแปลงทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน ได้แก่ ฝ้ายพันธุ์ตากฟ้า 2 คลุกเมล็ดฝ้ายก่อนปลูกด้วยสารฆ่าแมลง imidacloprid 70%WS อัตรา 5 กรัมต่อเมล็ดฝ้าย 1 กิโลกรัม ใช้ปุ๋ยตามผลการวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารของดินในแต่ละแปลง การป้องกันกำจัดโรค แมลงและวัชพืชในฝ้าย การตรวจนับแมลงศัตรูฝ้าย แมลงศัตรูธรรมชาติ พ่นสารฆ่าแมลงตามระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจของแมลงแต่ละชนิด ในช่วงต้นฤดูใช้เชื้อไวรัส NPV และปล่อยแตนเบียนไข่ *Trichogramma* ในช่วงปลายฤดูใช้เชื้อไวรัส NPV ร่วมกับสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย ใช้เทคนิคการพ่นสารฆ่าแมลงแบบใช้น้ำน้อย มีการติดตามตรวจสอบผลกระทบของสารฆ่าแมลงต่อเกษตรกรด้วยการเจาะเลือดหาระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรส ผลการดำเนินงานในปี 2546 แปลงทดสอบสาธิตมีผลผลิตฝ้ายมากกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรเฉลี่ย 62.16 กิโลกรัมต่อไร่หรือมากกว่า 41.67% มีกำไรสุทธิสูงกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรเฉลี่ย 1,150.71 บาทต่อไร่ หรือมากกว่า 64.11% จำนวนครั้งพ่นสารฆ่าแมลงลดลง 1 ครั้ง หรือ 50%

คำนำ

ฝ้ายเป็นพืชเส้นใยที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมสิ่งทอภายในประเทศที่มีการขยายตัวมากขึ้นทั้งผลิตภัณฑ์พื้นบ้านและส่งออก ซึ่งมีความต้องการใช้ฝ้ายปุยเป็นวัตถุดิบประมาณปีละ 350,000 ตัน และทำรายได้เข้าประประเทศคิดเป็นมูลค่ากว่า 100,000 ล้านบาท จากการส่งออกผลิตภัณฑ์สิ่งทอ แต่ผลผลิตฝ้ายปุยไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ ทั้งที่การปลูกฝ้ายถูกบรรจุเป็นเป้าหมายในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ตั้งแต่ฉบับที่ 1 เป็นต้นมา จึงอาจกล่าวได้ว่าเวลา 35 ปี ที่ผ่านมาการส่งเสริมการปลูกฝ้ายไม่บรรลุเป้าหมาย ซึ่งอุปสรรคสำคัญของการผลิตฝ้าย คือ ภาวะการตลาดที่ไม่แน่นอน ราคาและความต้องการขึ้นอยู่

---

[1] ทะเบียนวิจัยเลขที่ 45 06 008 002

[2] กลุ่มวิชาการ สถาบันวิจัยพืชไร่

กับปริมาณฝ้ายในตลาดต่างประเทศ ตลอดจนการระบาดของแมลงศัตรูฝ้ายซึ่งมีหลายชนิดและเข้าทำลายฝ้ายตั้งแต่เริ่มงอกจนถึงเก็บเกี่ยว แมลงศัตรูฝ้ายที่สำคัญ คือ ในระยะฝ้ายเล็กมีแมลงจำพวกปากดูดฝ้ายเข้าระบาดทำลาย ซึ่งถ้าระบาดมากทำให้ต้นฝ้ายตายไม่สามารถเก็บผลผลิตฝ้ายได้เลยได้แก่ เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* Glover เป็นพาหนะของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคใบหงิก เพลี้ยจักจั่นฝ้าย *Amrasca biguttula* (Ishida) ดูดน้ำเลี้ยงจากใบและปล่อยสารพิษทำให้ใบฝ้ายแห้งกรอบ ฝ้ายชงักการเจริญเติบโตทำให้ผลผลิตลดลง ในระยะฝ้ายมีดอก สมอ ซึ่งเป็นผลผลิตโดยตรง มีหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* Hubner เข้าทำลายกัดกิน ถ้าระบาดมากจะเก็บผลผลิตไม่ได้เลย จากการที่ฝ้ายมีศัตรูเข้าทำลายหลายชนิดในช่วงเวลาต่างกันทำให้เกษตรกรมีการป้องกันกำจัดโดยการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วและสะดวก แต่ในทางกลับกันการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูฝ้ายอย่างขาดความรู้ความระมัดระวังในการใช้ยังผลเสียอย่างรุนแรงต่อตัวเกษตรกรผู้ใช้ สภาพนิเวศวิทยาและทำให้ศัตรูพืชสร้างความต้านทานโดยเฉพาะหนอนเจาะสมอฝ้าย นอกจากปัญหาด้านแมลงแล้วยังมีปัญหาด้านโรคฝ้ายและวัชพืชก็มีความสำคัญรองลงมาที่ทำให้ผลผลิตฝ้ายลดลงและเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตฝ้ายให้แก่เกษตรกรด้วย จากปัญหาต่างๆที่กล่าวมานี้ การทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน จึงมีบทบาทสำคัญในการนำเอาผลงานวิจัยพื้นฐานด้านต่างๆในการผลิตฝ้าย ได้แก่ ด้านพันธุ์ฝ้าย เขตกรรม ดินปุ๋ย โรคฝ้าย วัชพืชในไร่ฝ้าย แมลงศัตรูฝ้าย แมลงศัตรูธรรมชาติ การพ่นสารแบบน้ำน้อย แนะนำถ่ายทอดสู่เกษตรกรอย่างใกล้ชิดในทุกด้าน เพื่อให้เกษตรกรปลูกฝ้ายได้กำไรสุทธิสูงสุด โดยคำนึงถึงความปลอดภัยของเกษตรกรและสภาพแวดล้อมด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.เมล็ดฝ้ายพันธุ์ ตากฟ้า 2

2.สารฆ่าแมลง imidacloprid (Guacho 70 %WS), imidacloprid (Admire 5%EC), lambda cyhalothrin (Pyretox-super 2.5%EC) , amitraz (Mitac 20%EC) , endosulfan (Thiodan 35%EC)

3.เชื้อไวรัส Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV 2 x 10^9 PIB)

4.แตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp.

5.เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังชนิดใช้แรงลมพร้อมชุดหัวฉีดน้ำน้อย

วิธีการ

แบ่งแปลงปลูกฝ้ายของเกษตรกรออกเป็น 2 แปลง คือ แปลงทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน รายละ 5 ไร่ ส่วนที่เหลือเป็นแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรรายละ 5 – 20 ไร่ ซึ่งใช้เป็นแปลงเปรียบเทียบประกอบด้วยเกษตรกร 6 ราย ปลูกฝ้ายในพื้นที่ 89 ไร่ แปลงทดสอบสาธิตควบคุมดูแลโดยนักวิชาการและเกษตรกรเจ้าของแปลงเป็นผู้ปฏิบัติตามคำแนะนำ สำหรับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร เกษตรกรเจ้าของแปลงเป็นผู้ดูแลรับผิดชอบเอง ต้องบันทึกการปฏิบัติงาน ค่าใช้จ่ายทุกอย่าง ค่าแรงงาน ค่าวัสดุการเกษตร เพื่อนำมาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิต รายได้ จำนวนครั้งการพ่นสาร

ป้องกันกำจัดศัตรูพืช ชนิด อัตราการใช้สารฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช เพื่อให้เกษตรกรเห็นความแตกต่างระหว่างแปลงทดสอบสาธิตกับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร

เทคโนโลยีที่ใช้ในแปลงทดสอบสาธิต

พันธุ์ เขตกรรม ดินปุ๋ย กำหนดให้ปลูกฝ้ายพันธุ์ตากฟ้า 2 ตามคำแนะนำของสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร ไถดะด้วยผาล 3 ตากดินทิ้งไว้ 2 – 3 สัปดาห์และพรวนด้วยผาล 7 ย่อยดินให้ละเอียดก่อนหยอดเมล็ดฝ้าย ปลูกให้แถวฝ้ายขวางทิศทางลมเพื่อความปลอดภัยจากพิษของสารเคมี ใช้ระยะปลูกระหว่างต้นและแถว 0.50 x 1.30 – 1.50 เมตร

การถอนแยก เมื่อฝ้ายอายุ 15 วันหลังงอก ถอนให้เหลือหลุมละ 2 ต้น ฝ้ายอายุ 30 วันหลังงอก ถอนให้เหลือหลุมละ 1 ต้น โดยเลือกต้นที่เป็นโรคและแคระแกรนทิ้งไป

การใช้ปุ๋ยเคมีกับฝ้าย ตามผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารทางเคมีของดินในแต่ละแปลง ซึ่งมีการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงของเกษตรกรก่อนปลูกฝ้าย เพื่อให้คำแนะนำการใช้ปุ๋ยที่ถูกต้องกับสภาพของดินในแต่ละแปลง

การป้องกันกำจัดวัชพืช ส่วนใหญ่เกษตรกรใช้สารเคมีป้องกันกำจัดวัชพืชระหว่างแถวฝ้าย ซึ่งจะกระทำกัน 2 ครั้งต่อฤดู โดยใช้สารกำจัดวัชพืช paraquat 27.6%SL อัตรา 300 มิลลิลิตรต่อไร่

การป้องกันกำจัดโรคฝ้าย ใช้ฝ้ายพันธุ์ต้านทานต่อโรคใบหงิกและโรคใบไหม้ คือ ฝ้ายพันธุ์ ตากฟ้า 2 และป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อนฝ้ายที่เป็นพาหะนำโรคใบหงิกด้วยการคลุกเมล็ดฝ้ายก่อนปลูกด้วยสารฆ่าแมลง imidacloprid 70%WS

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย จัดอบรมให้ความรู้กับเกษตรกรเกี่ยวกับ ชนิดของแมลงศัตรูฝ้าย วิธีการตรวจนับแมลง กำหนดระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจของแมลงศัตรูฝ้ายแต่ละชนิดที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการพ่นสารฆ่าแมลง แนะนำชนิด อัตราและวิธีการใช้สารฆ่าแมลงที่ถูกต้อง

การตรวจนับแมลง สุ่มนับต้นฝ้ายให้กระจายทั่วทั้งแปลงในพื้นที่ 5 ไร่ ตรวจนับเพลี้ยอ่อนฝ้าย เพลี้ยจักจั่นฝ้าย จากฝ้าย 30 ต้น ต้นละ 5 ใบ ตรวจนับหนอนเจาะสมอฝ้าย ทั่วทั้งต้นจากฝ้าย 30 ต้น

ระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจของฝ้ายที่ต้องพ่นสารฆ่าแมลง (เกศราและคณะ , 2545)

เพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossypii* พ่นสารฆ่าแมลงถ้าพบเกิน 10 ตัวต่อใบ

เพลี้ยจักจั่นฝ้าย *Amrasca biguttula* พ่นสารฆ่าแมลงถ้าพบตัวอ่อนเกิน 1 ตัวต่อใบ เมื่อฝ้ายอายุ 1 – 30 วันหลังงอก และพ่นเมื่อพบเกิน 2 ตัวต่อใบ ฝ้ายอายุ 31 – 120 วันหลังงอก

หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa amigera* พ่นสารฆ่าแมลงหรือเชื้อจุลินทรีย์ตามที่กำหนดถ้าพบหนอนเกิน 9 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น เมื่อฝ้ายอายุ 31 – 60 และ 91 –120 วันหลังงอก และพ่นเมื่อพบหนอนเกิน 6 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น ฝ้ายอายุ 61 – 90 วันหลังงอก

ชนิดและวิธีการใช้สารฆ่าแมลง

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายจำพวกปากดูด คลุกเมล็ดพันธุ์ฝ้ายก่อนปลูกด้วยสารฆ่าแมลง imidacloprid 70%WS อัตรา 5 กรัมต่อเมล็ดฝ้าย 1 กิโลกรัม หลังจากฝ้ายอายุ 30 วันหลังงอก เมื่อมีแมลงศัตรู

ฝ้ายจำพวกปากดูดระบาดเกินระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจใช้สารฆ่าแมลง imidacloprid 5%EC อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อไร่ (กองกีฏและสัตววิทยา , 2545)

การป้องกันกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้าย กำหนดการใช้สารชีวินทรีย์และปล่อยแมลงศัตรูธรรมชาติหรือสารฆ่าแมลง ตามช่วงอายุของฝ้ายเมื่อพบหนอนเจาะสมอฝ้ายระบาดมากกว่าระดับเศรษฐกิจ คือ

ฝ้ายอายุ 31 – 60 วันหลังงอก ใช้เชื้อไวรัส NPV 2 x 10^9 PIB อัตรา 150 กรัมต่อไร่ ปล่อยแตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. อัตรา 30,000 ตัวต่อไร่ต่อครั้ง จำนวน 4 ครั้ง (อุทัย , 2540)

ฝ้ายอายุ 61 – 90 วันหลังงอก พ่นสารฆ่าแมลง amitraz + endosulfan อัตรา 120 + 240 มิลลิลิตรต่อไร่

ฝ้ายอายุ 91 – 120 วันหลังงอก พ่นสารฆ่าแมลง lambda cyhalothrin ผสมกับเชื้อไวรัส NPV อัตรา 80 มิลลิลิตร + 75 กรัมต่อไร่

เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย (ไพศาล , 2544) นำวิธีการพ่นสารฆ่าแมลงแบบใช้น้ำน้อย ซึ่งมีอัตราการใช้น้ำระหว่าง 5 – 30 ลิตรต่อไร่ มาใช้แทนการพ่นสารฆ่าแมลงแบบเดิมของเกษตรกรที่ใช้น้ำมากตั้งแต่ 50 – 120 ลิตรต่อไร่ โดยใช้เครื่องยนต์พ่นสารสะพายหลังชนิดใช้แรงลมที่เกษตรกรใช้อยู่ทั่วไป พร้อมหัวฉีดแบบน้ำน้อย มีอัตราการใช้น้ำผสมสารฆ่าแมลงตามอายุฝ้าย คือ

ฝ้ายอายุ 7 – 35 วันหลังงอก ใช้อัตราการพ่น 5 – 10 ลิตรต่อไร่ หัวฉีดขนาด 3”/64 เบอร์ 3

ฝ้ายอายุ 36 – 63 วันหลังงอก ใช้อัตราการพ่น 10 – 20 ลิตรต่อไร่ หัวฉีดขนาด 1”/16 เบอร์ 1

ฝ้ายอายุ 64 – 120 วันหลังงอก ใช้อัตราการพ่น 20 – 30 ลิตรต่อไร่ หัวฉีดขนาด 1”/16 เบอร์1

การป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพ การใช้เชื้อไวรัส NPV ป้องกันกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้ายในช่วงต้นฤดูและผสมกับสารฆ่าแมลงในช่วงปลายฤดู อัตรา 150 แล 75 กรัมต่อไร่ เมื่อพบหนอนเจาะสมอฝ้ายระบาดมากกว่าระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ (อุทัย , 2540) ปล่อยแตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. ในช่วงต้นฤดูอัตรา 30,000 ตัวต่อไร่ต่อครั้ง จำนวน 4 ครั้ง (สถิตย์, 2544)

งานวิจัยวัถตุมีพิษ เป็นการติดตามผลกระทบของการใช้สารเคมีในไร่ฝ้ายของเกษตรกรทั้งชนิด อัตรา ความถี่ วิธีการและระยะเวลาที่ใช้สารเคมี โดยการเจาะเลือดเกษตรกรก่อนการใช้สารเคมีต้นฤดู ในระหว่างการใช้สารเคมีกลางฤดูและหลังการใช้สารเคมีปลายฤดูช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิต นำเลือดเกษตรกรมาตรวจวัดหาระดับการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในเม็ดเลือดแดงและพลาสม่า ซึ่งเป็นดัชนีบงชี้ว่ามีสารเคมีเข้าสู่ร่างกายเกษตรกรถึงระดับอันตรายหรือไม่ (ดำเนินการโดยสำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร)

การบันทึกข้อมูล

ปริมาณแมลงศัตรูฝ้าย แมลงศัตรูธรรมชาติ โรคฝ้าย วัชพืชที่พบในไร่ฝ้าย ชนิด อัตราและจำนวนครั้งในการพ่นสารฆ่าแมลง สารกำจัดวัชพืช ต้นทุนการผลิต ค่าวัสดุการเกษตร ค่าแรงงาน ผลผลิตฝ้าย มูลค่าผลผลิต กำไรสุทธิ ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง

เวลาและสถานที่

เดือนพฤษภาคม 2546 – มกราคม 2547

ไร่เกษตรกร หมู่ 5 ตำบลพระเพลิง อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปลูกฝ้ายวันที่ 7 กรกฎาคม – 20 กรกฎาคม 2546

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สารป้องกันกำจัดศัตรูฝ้าย (ตารางที่ 1)

แปลงทดสอบสาธิต การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายจำพวกปากดูดในช่วงต้นฤดู ฝ้ายอายุ 30 – 45 วันหลังงอก เพื่อเป็นการอนุรักษ์แมลงศัตรูธรรมชาติ คลุกเมล็ดพันธุ์ฝ้ายด้วยสารฆ่าแมลง imidacloprid 70%WS อัตรา 5 กรัมต่อเมล็ดฝ้าย 1 กิโลกรัม หลังจากฝ้ายอายุ 45 วันหลังงอก ใช้ระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจของแมลงศัตรูฝ้ายแต่ละชนิดเป็นตัวกำหนดในการพ่นสารฆ่าแมลง ในช่วงฝ้ายอายุ 89 วันหลังงอก พบเพลี้ยจักจั่นฝ้ายเฉลี่ย 1.15 ตัวต่อใบ หนอนม้วนใบฝ้าย 28 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น มีการพ่นสารฆ่าแมลง 1 ครั้ง ใช้สารฆ่าแมลง lambda cyhalothrin 2.5%EC อัตรา 160 มิลลิลิตรต่อไร่ สำหรับป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นฝ้าย และหนอนม้วนใบฝ้าย

แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร ในช่วงฝ้ายอายุ 61 และ 75 วันหลังงอก พบเพลี้ยจักจั่นฝ้ายเฉลี่ย 1.31 และ 1.45 ตัวต่อใบ หนอนม้วนใบฝ้าย 13 และ 14 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น มีการพ่นสารฆ่าแมลง dimethoate 40%EC อัตรา 100 มิลลิลิตรต่อไร่ จำนวน 2 ครั้ง

สารกำจัดวัชพืช เกษตรกรฉีดพ่นระหว่างแถวฝ้ายโดยใช้สาร paraquat 27.6%SL อัตรา 300 มิลลิลิตรต่อไร่ ทั้งแปลงทดสอบสาธิตและแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร จำนวน 2 ครั้ง

2. การแพร่ระบาดของแมลงศัตรูฝ้ายที่สำคัญ (ตารางที่ 2)

เพลี้ยอ่อนฝ้าย พบระบาดไม่เกินระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยพบเพลี้ยอ่อนฝ้ายระบาดเมื่อฝ้ายอายุ 26 วันหลังงอก แปลงทดสอบสาธิตสูงสุดเฉลี่ย 5.10 ตัวต่อใบ แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรสูงสุดเฉลี่ย 5.78 ตัวต่อใบ

เพลี้ยจักจั่นฝ้าย พบระบาดไม่เกินระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ โดยพบเพลี้ยจักจั่นฝ้ายระบาดเมื่อฝ้ายอายุ 89 วันหลังงอก แปลงทดสอบสาธิตสูงสุดเฉลี่ย 1.15 ตัวต่อใบ แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร ฝ้ายอายุ 61 และ 75 วันหลังงอก สูงสุดเฉลี่ย 1.31 และ 1.45 ตัวต่อใบ

หนอนม้วนใบฝ้าย ฝ้ายอายุ 68 วันหลังงอก แปลงทดสอบสาธิตพบสูงสุด 28 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร ฝ้ายอายุ 89 วันหลังงอก สูงสุด 28 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น

หนอนเจาะยอดและสมอสะไปนี่ พบระบาดตั้งแต่ฝ้ายอายุ 26 วันหลังงอกขึ้นไป โดยแปลงทดสอบสาธิตสูงสุด 4 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรสูงสุด4 ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น

หนอนเจาะสมอฝ้าย ไม่พบการระบาด

3. แมลงศัตรูธรรมชาติ (ตารางที่ 3)

จากการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบเป็นแมลงห้ำและพบมากคือ แมงมุม ด้วงดิน ด้วงเต่าลาย โดยตรวจนับจากฝ้ายจำนวน 100 ต้น แปลงทดสอบสาธิต พบแมงมุมสูงสุด 44 ตัว ฝ้ายอายุ 97 วันหลังงอก

ด้วงดินสูงสุด176 ตัว ฝ้ายอายุ 62 วันหลังงอก ด้วงเต่าลายสูงสุด 36 ตัว ฝ้ายอายุ 69 วันหลังงอก แปลงเปรียบเทียบตามวิธีการของเกษตรกร พบแมงมุมสูงสุด 44 ตัว ฝ้ายอายุ 97 วันหลังงอก ด้วงดินสูงสุด 164 ตัว ฝ้ายอายุ 27 วันหลังงอก ด้วงเต่าลาย 36 ตัว ฝ้ายอายุ 62 – 69 วันหลังงอก

4. ต้นทุนการผลิต (ตารางที่ 4)

ต้นทุนการผลิตฝ้ายแยกเป็น 2 ประเภท คือ ต้นทุนประเภทค่าแรงงาน ได้แก่ ค่าแรงงานเตรียมดิน ค่าแรงงานปลูก ค่าแรงงานใส่ปุ๋ยดายหญ้าพูนโคน ค่าแรงงานพ่นสารกำจัดวัชพืช ค่าแรงงานพ่นสารฆ่าแมลง ค่าแรงงานเก็บเกี่ยวผลผลิตฝ้าย และต้นทุนประเภทค่าวัสดุการเกษตร ได้แก่ ค่าเมล็ดพันธุ์ ค่าปุ๋ยเคมี ค่าสารกำจัดวัชพืช ค่าสารฆ่าแมลง ค่าน้ำมันเชื้อเพลิงในการพ่นสารฆ่าแมลง

แปลงทดสอบสาธิต มีต้นทุนการผลิตฝ้ายทั้งหมดเฉลี่ย 1,595.75 บาทต่อไร่ เป็นค่าแรงงานทั้งหมด 1,048.98 บาทต่อไร่ หรือ 65.74% ของต้นทุนการผลิตฝ้าย โดยเป็นค่าแรงงานเก็บเกี่ยวผลผลิตฝ้าย 437.50 บาทต่อไร่ หรือ 41.70 % ของค่าแรงงานทั้งหมด มีค่าวัสดุการเกษตร 546.77 บาทต่อไร่ หรือ 34.26 %ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด

แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร มีต้นทุนการผลิตฝ้ายทั้งหมดเฉลี่ย 1,333.57 บาทต่อไร่ เป็นค่าแรงงานทั้งหมด 880.23 บาทต่อไร่ หรือ 66.00 %ของต้นทุนการผลิตฝ้าย โดยเป็นค่าแรงงานเก็บเกี่ยวผลผลิตฝ้าย 255.53 บาทต่อไร่ หรือ 29.02 %ของค่าแรงงานทั้งหมด ค่าวัสดุการเกษตรทั้งหมด 453. 34 บาทต่อไร่ หรือ 34 .00 % ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด

จากการเก็บข้อมูลต้นทุนการผลิตฝ้ายทั้งหมดพบว่า แปลงทดสอบสาธิต มีต้นทุนรวม 1,595.75 บาทต่อไร่ ขณะที่แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรมีต้นทุนรวม 1,333.57 บาทต่อไร่ ซึ่งแปลงทดสอบสาธิตมีต้นทุนสูงกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร 262.18 บาทต่อไร่ หรือ 16.42 %

5. มูลค่าการใช้สารฆ่าแมลง (ตารางที่ 5) แปลงทดสอบสาธิต มีมูลค่าการใช้สารฆ่าแมลงเฉลี่ย 204.75 บาทต่อไร่ สูงกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรเฉลี่ย 153.29 บาทต่อไร่ หรือ 74 .86 % แปลงทดสอบสาธิตมีจำนวนครั้งการพ่นสารฆ่าแมลงน้อยกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร 1 ครั้ง ลดลง 50% และมีค่าน้ำมันเชื้อเพลิงในการพ่นสารฆ่าแมลงน้อยกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรเฉลี่ย 23.17 %

ผลผลิตฝ้ายปุย (ตารางที่ 5) แปลงทดสอบสาธิตได้ผลผลิตฝ้ายสูงกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรเฉลี่ย 62.16 กิโลกรัมต่อไร่หรือ 41.67 %

6. มูลค่าผลผลิตฝ้าย กำไรสุทธิ ผลตอบแทนเชิงเศรษฐศาสตร์ (ตารางที่ 6)

แปลงทดสอบสาธิตมีมูลค่าผลผลิตเฉลี่ย 3,390.40 บาทต่อไร่ กำไรสุทธิเฉลี่ย 1,794.65 บาทต่อไร่ สัดส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุน 2.12

แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร มีมูลค่าผลผลิตเฉลี่ย 1,977.51 บาทต่อไร่ กำไรสุทธิเฉลี่ย 643.94 บาทต่อไร่ สัดส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุน 1.48

จากการที่แปลงทดสอบสาธิตมีผลผลิตฝ้ายสูงกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีการของเกษตรกร ทำให้แปลงทดสอบสาธิตมีมูลค่าผลผลิตเฉลี่ยสูงกว่าแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกรเฉลี่ย 1,412.89 บาทต่อไร่ หรือ 41.67 % มีกำไรสุทธิสูงกว่าเฉลี่ย 1,150.71 บาทต่อไร่ หรือ 64.11 %

ผลการทำแปลงทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน ในปี 2546 เกษตรกรยอมรับเทคโนโลยีที่นำไปแนะนำพร้อมทั้งปฏิบัติตามได้ดีอยู่ในระดับที่สามารถถ่ายทอดสู่ผู้สนใจได้ แต่การที่ได้ผลผลิตฝ้ายปุยต่ำเนื่องจากช่วงปลายเดือนกันยายน 2546 มีฝนตกชุกทำให้น้ำท่วมแปลงฝ้าย เป็นเหตุให้สมอฝ้ายร่วงต้นฝ้ายเน่าตายประกอบกับสภาพแปลงฝ้ายของเกษตรกรเป็นดินลูกรัง การเตรียมดินของเกษตรกรไม่ดีพอ ส่งผลให้ต้นฝ้ายแคระแกรนเพราะรากฝ้ายไม่สามารผ่านลูกรังลงไปได้ลึกทำให้ฝ้ายมีลำต้นเตี้ยเล็กจึงได้ผลผลิตต่ำไปด้วย

สรุปผลการทดลอง

ผลการดำเนินงานทดสอบสาธิตการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้ายโดยวิธีผสมผสาน เกษตรกรยอมรับเทคนิคการพ่นสารแบบน้ำน้อยที่ทำให้เกษตรกรพ่นสารฆ่าแมลงได้รวดเร็ว ประหยัดแรงงาน เวลาและน้ำมันเชื้อเพลิง การตรวจนับแมลงศัตรูฝ้ายก่อนการใช้สารฆ่าแมลง ว่ามีประโยชน์และลดการใช้สารฆ่าแมลงได้ ตลอดถึงพันธุ์ฝ้ายตากฟ้า 2 ระยะปลูก การใช้ปุ๋ยเคมี จากการดำเนินงานในปี 2546 พบว่าแปลงทดสอบสาธิตมีผลผลิตฝ้ายเพิ่มขึ้น 41.67 % มีรายได้เพิ่มขึ้น 41.67 % มีกำไรสุทธิเพิ่มขึ้น 64.11 % จำนวนครั้งการพ่นสารฆ่าแมลงลดลง 50%

เอกสารอ้างอิง

กองกีฏและสัตววิทยา., 2545 . คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2545 . เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา . กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . 279 น.

เกศรา จีระจรรยา , สุเทพ สหายา , ลักขณา บำรุงศรี , สุพจน์ กิตติบุญญา . 2545 . แมลงศัตรูฝ้ายที่สำคัญและการบริหาร . เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา . กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ . 52 น.

ไพศาล รัตนเสถียร . 2544 . การพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงศัตรูฝ้าย . เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา . กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . 43 น.

สถิตย์ ปฐมรัตน์ , 2544 . การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมม่า . น. 65 – 86 *ใน* การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน . เอกสารวิชาการกองกีฏและสัตววิทยา . กรมวิชาการเกษตร , กรุงเทพฯ .

อุทัย เกตุนุติ . 2540 . การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อไวรัส เอ็น.พี .วี. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร . กรุงเทพฯ . 72 น.

ตารางที่ 1 ชนิดและอัตราการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูฝ้ายระหว่างแปลงทดสอบสาธิต กับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปี 2546

แปลงทดสอบสาธิต		แปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร	
สารเคมี	อัตราที่ใช้ต่อไร่	สารเคมี	อัตราที่ใช้ต่อไร่
<u>สารฆ่าแมลง</u>		<u>สารฆ่าแมลง</u>	
imidacloprid 70%WS	7.5 กรัม	dimethoate 40%EC	100 มิลลิลิตร
lambda cyhalothrin 2.5%EC	160 มิลลิลิตร		
<u>สารกำจัดวัชพืช</u>		<u>สารกำจัดวัชพืช</u>	
paraquat 27.6%SL	300 มิลลิลิตร	paraquat 27.6%SL	300 มิลลิลิตร
		glyphosate 48%EC	300 มิลลิลิตร

ตารางที่ 2 จำนวนแมลงศัตรูฝ้ายที่ตรวจพบระหว่างแปลงทดสอบสาธิตกับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีการของเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปี 2546

อายุฝ้าย (วัน)	จำนวนแมลงปากดูดฝ้าย (ตัวต่อใบ)*				จำนวนแมลงปากกัด (ตัวต่อฝ้าย 30 ต้น)*			
	เพลี้ยอ่อนฝ้าย		เพลี้ยจักจั่นฝ้าย		หนอนม้วนใบฝ้าย		หนอนเจาะสมอสะไปนี่	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	0	0
19	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	0	0
26	5.10	5.78	0.05	0.18	0	0	3	1
33	2.83	3.36	0.16	0.25	1	3	4	1
40	1.25	3.95	0.28	0.28	3	8	2	2
47	2.50	1.73	0.38	0.46	4	5	4	3
54	2.33	1.16	0.60	0.76	6	7	3	2
61	1.00	0.76	0.80	1.31	12	13	3	3
68	1.03	0.46	1.01	1.01	28	9	3	3
75	1.45	0.75	0.95	1.45	13	14	4	4
82	0.55	0.73	0.96	1.06	15	22	3	4
89	0.73	0.63	1.15	1.18	16	28	2	3
96	0.66	0.43	0.98	1.26	15	19	1	1

* ค่าเฉลี่ยจากจำนวนเกษตรกร 6 ราย

ตารางที่ 3 จำนวนแมลงศัตรูธรรมชาติที่พบระหว่างแปลงทดสอบสาธิตกับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปี 2546

อายุฝ้าย (วัน)	จำนวนศัตรูธรรมชาติ (ตัวต่อฝ้าย 100 ต้น) *					
	แมงมุม		ด้วงดิน		ด้วงเต่าลาย	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
13	8	20	168	152	8	8
20	12	20	156	112	20	20
27	24	20	280	164	16	20
34	24	28	176	148	32	24
41	28	24	136	144	36	28
48	20	32	156	132	32	28
55	24	28	156	116	36	28
62	32	32	176	124	28	36
69	36	36	140	140	36	36
76	28	28	140	124	32	32
83	36	36	136	136	28	28
90	36	36	132	136	36	28
97	44	44	124	120	28	32

* ค่าเฉลี่ยจากจำนวนเกษตรกร 6 ราย

ตารางที่ 4 ต้นทุนการผลิตฝ้ายระหว่างแปลงทดสอบสาธิตกับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีการของเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปี2546

รายการ	นายทองย้อย		นายสายยนต์		นายสายัันต์		นายเฉลียว	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
ค่าวัสดุการเกษตร (บาท/ไร่)								
ค่าเมล็ดพันธุ์	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
ค่าปุ๋ยเคมี	176.87	250.14	136.40	268.40	224.93	261.45	334.05	370.57
ค่าสารกำจัดวัชพืช	40.50	40.50	150.00	150.00	32.76	32.76	276.00	276.00
ค่าสารฆ่าแมลง	204.75	36.00	204.75	54.00	204.75	38.57	204.75	54.24
ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง	3.80	3.80	3.80	3.80	5.70	4.07	3.80	5.42
รวมค่าวัสดุการเกษตรทั้งหมด (บาท/ไร่)	**440.92**	**345.44**	**509.95**	**491.20**	**483.14**	**351.85**	**833.60**	**721.23**
ค่าแรงงาน (บาท/ไร่)								
ค่าเตรียมดิน	270.00	270.00	270.00	270.00	280.00	280.00	290.00	290.00
ค่าแรงงานปลูก	114.00	114.00	100.00	100.00	110.00	110.00	112.00	112.00
ค่าแรงงานถอนแยก	25.00	25.00	40.00	40.00	35.00	35.00	35.00	35.00
ค่าแรงงานใส่ปุ๋ย	25.00	25.00	24.00	24.00	16.00	16.00	20.00	20.00
ค่าแรงงานดายหญ้าพูนโคน	40.00	40.00	40.00	40.00	60.00	60.00	185.00	185.00
ค่าแรงงานพ่นสารกำจัดวัชพืช	20.00	20.00	15.00	15.00	25.00	25.00	50.00	50.00
ค่าแรงงานพ่นสารฆ่าแมลง	30.00	30.00	30.00	15.00	30.00	21.42	30.00	42.85
ค่าแรงงานเก็บเกี่ยวผลผลิต	420.00	318.00	450.00	195.00	600.00	214.28	300.00	159.72
รวมค่าแรงงานทั้งหมด (บาท/ไร่)	**944.00**	**842.00**	**969.00**	**699.00**	**1,156..00**	**761.70**	**1,022.00**	**894.57**
รวมต้นทุนทั้งหมด (บาท/ไร่)	**1,384.92**	**1,187.44**	**1,478.95**	**1,190.20**	**1,639.14**	**1,113.55**	**1,855.60**	**1,615.80**

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รายการ	นางสังวาล		นางดอกแก้ว		เฉลี่ยจาก 6 ราย	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
ค่าวัสดุการเกษตร (บาท/ไร่)						
ค่าเมล็ดพันธุ์	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
ค่าปุ๋ยเคมี	278.27	351.54	169.15	169.15	219.94	278.53
ค่าสารกำจัดวัชพืช	42.00	42.00	76.00	76.00	102.87	102.87
ค่าสารฆ่าแมลง	204.75	54.00	204.75	72.00	204.75	51.46
ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง	3.80	11.40	4.40	4.40	4.21	5.48
รวมค่าวัสดุการเกษตรทั้งหมด (บาท/ไร่)	**543.82**	**473.94**	**469.30**	**336.55**	**546.77**	**453.34**
ค่าแรงงาน (บาท/ไร่)						
ค่าเตรียมดิน	270.00	270.00	290.00	290.00	278.33	278.33
ค่าแรงงานปลูก	107.00	107.00	90.00	90.00	105.49	105.49
ค่าแรงงานถอนแยก	60.00	60.00	20.00	20.00	35.83	35.83
ค่าแรงงานใส่ปุ๋ย	53.00	53.00	30.00	30.00	28.00	28.00
ค่าแรงงานดายหญ้าพูนโคน	193.00	193.00	70.00	70.00	98.00	98.00
ค่าแรงงานพ่นสารกำจัดวัชพืช	60.00	60.00	45.00	45.00	35.83	35.83
ค่าแรงงานพ่นสารฆ่าแมลง	30.00	90.00	30.00	60.00	30.00	43.21
ค่าแรงงานเก็บเกี่ยวผลผลิต	600.00	450.00	255.00	196.20	437.50	255.53
รวมค่าแรงงานทั้งหมด (บาท/ไร่)	**1,373.00**	**1,283.00**	**830.00**	**801.20**	**1,048.98**	**880.23**
รวมต้นทุนทั้งหมด (บาท/ไร่)	**1,916.82**	**1,756.94**	**1,299.30**	**1,137.75**	**1,595.75**	**1,333.57**

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบมูลค่าการใช้สารเคมีระหว่างแปลงทดสอบสาธิตกับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีการของเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปี 2546

รายการ	ทองย้อย		สายยนต์		สายันต์		เฉลียว	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
1. มูลค่าการใช้สารเคมี (บาทต่อไร่)	305.25	76.50	414.75	204.00	297.51	71.33	540.75	330.24
1.1 สารฆ่าแมลง	204.75	36.00	204.75	54.00	204.75	38.57	204.75	54.24
เพิ่มขึ้น (%)	+82.41		+73.62		+81.16		+73.50	
1.2 แคนเบียนไข่	60.00		60.00		60.00		60.00	
1.3 สารกำจัดวัชพืช	40.50	40.50	150.00	150.00	32.76	32.76	276.00	276.00
เพิ่มขึ้น/ลดลง (%)								
2. จำนวนครั้งการใช้สารเคมี (ครั้งต่อฤดู)	3.00	4.00	3.00	4.00	3.00	3.00	3.00	4.00
2.1 สารฆ่าแมลงปากดูดฝ้าย	1.00	2.00	1.00	2.00	1.00	1.00	1.00	2.00
ลดลง (%)	50.00		50.00				50.00	
2.2 สารกำจัดวัชพืช	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
เพิ่มขึ้น/ลดลง (%)								
3. ค่าน้ำมันเชื้อเพลิงในการพ่นสารเคมี (บาท/ไร่)	3.80	3.80	3.80	3.80	5.70	4.07	3.80	5.42
ลดลง (%)					+28.59		29.88	
4. ผลผลิตฝ้ายปุย กก.ต่อไร่	140.00	106.30	150.00	65.00	200.00	71.42	120.00	63.89
เพิ่มขึ้น (%)	24.07		56.66		60.29		46.75	

ตารางที่ 5 (ต่อ)

รายการ	สังวาล		ดอกแก้ว		เฉลี่ย	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
1. มูลค่าการใช้สารเคมี (บาทต่อไร่)	306.75	96.00	340.75	148.00	367.62	154.33
1.1 สารฆ่าแมลง	204.75	54.00	204.75	72.00	204.75	51.46
เพิ่มขึ้น (%)	+73.62		+64.83		+74.86	
1.2 แคนเบียนไข่	60.00		60.00		60.00	
1.3 สารกำจัดวัชพืช	42.00	42.00	76.00	76.00	102.87	102.87
เพิ่มขึ้น/ลดลง (%)						
2. จำนวนครั้งการใช้สารเคมี (ครั้งต่อฤดู)	3.00	5.00	3.00	4.00	3.00	4.00
2.1 สารฆ่าแมลงปากดูดฝ้าย	1.00	3.00	1.00	2.00	1.00	2.00
เพิ่มขึ้น/ลดลง (%)	66.66		50.00		50.00	
2.2 สารกำจัดวัชพืช	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
เพิ่มขึ้น /ลดลง (%)						
3. ค่าน้ำมันเชื้อเพลิงในการพ่นสารเคมี (บาท/ไร่)	3.80	11.40	4.40	4.40	4.21	5.48
ลดลง (%)	66.66				23.17	
4. ผลผลิตฝ้ายปุย (กก.ต่อไร่)	200.00	150.00	85.00	65.40	149.16	87.00
เพิ่มขึ้น (%)	25.00		23.52		41.67	

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบผลตอบแทนทางเศรษฐกิจระหว่างแปลงทดสอบสาธิตกับแปลงเปรียบเทียบตามวิธีของเกษตรกร อำเภอเขาฉกรรจ์ จังหวัดสระแก้ว ปี 2546

รายการ	ทองย้อย		สายยนต์		สายันต์		เฉลียว	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
1. ต้นทุนการผลิตฝ้ายทั้งหมด(บาทต่อไร่)	1,384.92	1,187.44	1,478.95	1,190.20	1,639.14	1,113..57	1,855.60	1,615.80
2. ผลผลิตฝ้ายปุย เฉลี่ย กก.ต่อไร่	140.00	106.30	150.00	65.00	200.00	71.42	120.00	63.89
3. รายได้ เฉลี่ยบาทต่อไร่	3,164.00	2,402.38	3,450.00	1,495.00	4,600.00	1,642.66	2,712.00	1,443.91
4. กำไรสุทธิ เฉลี่ย บาทต่อไร่	1,779.08	1,214.94	1,971.05	304.80	2,960.86	529.09	856.40	-171.89
เพิ่มขึ้น/ลดลง (%)	+31.70		+84.53		+82.13		+120.07	
5. ราคาฝ้ายปุย บาทต่อกก.	22.60	22.60	23.00	23.00	23.00	23.00	22.60	22.60
6. สัดส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุน	2.28	2.02	2.33	1.25	2.80	1.47	1.46	0.89

ตารางที่ 6 (ต่อ)

รายการ	สังวาล		ดอกแก้ว		เฉลี่ย	
	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร	ทดสอบ	เกษตรกร
1. ต้นทุนการผลิตฝ้ายทั้งหมด(บาทต่อไร่)	1,916.82	1,756.94	1,299.30	1,137.75	1,595.75	1,333.57
2. ผลผลิตฝ้ายปุย เฉลี่ย กก.ต่อไร่	200.00	150.00	85.00	65.40	149.16	87.00
3. รายได้ เฉลี่ยบาทต่อไร่	4,520.00	3,390.00	1,921.00	1,478.04	3,390.40	1,977.51
4. กำไรสุทธิ เฉลี่ย บาทต่อไร่	2,603.18	1,633.06	621.70	340.29	1,794.65	643.94
เพิ่มขึ้น/ลดลง (%)	+37.26		45.26		+64.11	
5. ราคาฝ้ายปุย บาทต่อกก.	22.60	22.60	22.60	22.60	22.73	22.73
6. สัดส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุน	2.35	1.92	1.47	1.29	2.12	1.48

ทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน

Integrated Pest Control on Asparagus

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ อุราพร หนูนารถ
มัณฑนา มิลน์[1/] สมรวย รวมชัยอภิกุล อุทัย เกตุนุติ
อัจฉรา ตันติโชดก รัตนา นชะพงษ์ ไพศาล รัตนเสถียร
จีรนุช เอกอำนวย นิยมรัฐ ไตรศรี[2/] จุมพล สาระนาค[2/]
สุปราณี อิ่มพิทักษ์[3/] ธีรพล อุ่นจิตต์วรรธนะ จิตนา ภู่มงกุฎชัย[4/]
เสริมสิริ คงแสงดาว[5/] ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน (IPM) ดำเนินการในแปลงเกษตรกร ตำบลสนามแย้ อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ระหว่างเดือน พฤษภาคม – สิงหาคม 2546 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและจำนวนศัตรูพืช แตนเบียนศัตรูธรรมชาติ ชนิดของสารกำจัดศัตรูพืชและอัตราการใช้ในการควบคุมศัตรูหน่อไม้ฝรั่ง น้ำหนักและราคาผลผลิต ต้นทุนการผลิต วิธีการทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสานประกอบด้วยการใช้ระดับเศรษฐกิจ กับดักกาวเหนียวสีเหลือง เชื้อจุลินทรีย์และสารฆ่าแมลง ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช การใช้สารกำจัดโรคพืชเพื่อกำจัดโรคพืช รวมทั้งการกำจัดวัชพืชโดยการถอนต้น วิธีดังกล่าวนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกร

การทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน (IPM) ด้วยการใช้ระดับเศรษฐกิจ เชื้อจุลินทรีย์ และกับดักกาวเหนียวสีเหลือง อัตรา 80 กับดักต่อไร่ เปรียบเทียบกับวิธีของเกษตรกรพบแมลงศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และเพลี้ยไฟ พบโรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ โรคต้นไหม้ ใบเทียมร่วง แอนแทรคโนส และวัชพืช 7 ชนิด ได้แก่ หญ้านกสีชมพู หญ้า

เลขที่ทะเบียนวิจัย 43 06 006 026

[1/]สำนักวิจัย และพัฒนาการผลิตสารธรรมชาติทางการเกษตร [2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[3/]สำนักประสานงานโครงการนำร่องการผลิตพืชผักและผลไม้อนามัย
[4/]สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร [5/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ตีนนก หญ้าดอกขาว ผักโขม เบี้ยหิน หญ้าน้ำนมราชสีห์ และแห้วหมู ใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช 2 ชนิด พ่นจำนวน 2 ครั้ง เปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกรมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืช 4 ชนิด 11 ครั้ง ด้วยสารที่มีระดับความเป็นพิษร้ายแรงยิ่ง (Ia)

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชในแปลงทดสอบ (IPM) พบหนอนกระทู้หอมสูงเกินระดับเศรษฐกิจ 1 คือ 1.01 ตัว/กอ และหนอนกระทู้หอมพบ 1 ครั้ง คือ 1.03 ตัว/กอ ทำการพ่นไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอมด้วยอัตราการพ่นสาร 80 ลิตร/ไร่ และหนอนกระทู้ผักรวม 2 ครั้ง ส่วนเพลี้ยไฟพบต่ำกว่าระดับที่กำหนดคือพบ 0.13-18.40 ตัว/กอ ส่วนวิธีเกษตรกรพ่นเชื้อจุลินทรีย์ 1 ชนิด คือ Bt. และสารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ abamectin สมุนไพรสุดเดช สมุนไพรน้ำเพ็ชร รวมพ่น 11 ครั้ง ด้วยอัตราการพ่น 80 ลิตร/ไร่

การป้องกันกำจัดโรคพืชในวิธีผสมผสาน พบโรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคต้นไหม้ โรคใบเทียมร่วง , แอนแทรคโนส และโรคเน่ายุบ ทำการพ่น copper oxychloride 6 ครั้ง benomyl 2 ครั้ง prochloraz 2 ครั้งรวม 10 ครั้ง ส่วนวิธีของเกษตรกร พ่น copper oxychloride 10 ครั้ง

จากการตรวจนับแมลงศัตรูธรรมชาติในแปลงทดสอบ (IPM) พบแตนเบียนหนอนชนิด *Microplitis Manilae* 53 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวิธีเกษตรกรพบ 59 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจนับเพลี้ยไฟและศัตรูธรรมชาติบนกับดักกาวเหนียวสีเหลืองในแปลงทดสอบ IPM พบเพลี้ยไฟ 34 ตัว/กับดัก และแตนเบียนหนอน *M. manilae* แมลงวันก้นขน และแมงมุมตัวห้ำ เฉลี่ย 3.2, 0.4 และ 0.4 ตัว/กับดัก ตามลำดับ

การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงทดสอบ (IPM) สามารถลดจำนวนครั้งในการพ่นสารลงได้ 81.82 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณลงได้อีก 84 เปอร์เซ็นต์ ได้น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด 779.25 ก.ก/ไร่ เป็นเงิน 21,447.37 บาท ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 2.45 ตามลำดับ ส่วนวิธีเกษตรกร 1 และ 2 ได้น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด 1,185.50 ก.ก/ไร่ เป็นเงิน 33,461.00 บาท ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.60

คำนำ

หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparaqus officinalis* Linnaeus) เป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญผลิตเพื่อการส่งออกทั้งในรูปบริโภคสดและผลิตเพื่อแปรรูปทางอุตสาหกรรม กมลและคณะ 2544 รายงานว่าปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกจำนวน 6,123 ไร่ มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกหน่อไม้ฝรั่งในปี 2542 มีประมาณ 1,537 ตัน คิดเป็นมูลค่า 135.91 ล้านบาท ซึ่งมีตลาดส่งออกมากกว่า 20 ประเทศ ตลาดส่งออกรายใหญ่ของประเทศไทยได้แก่ ญี่ปุ่น แต่การผลิตหน่อไม้ฝรั่งเพื่อส่งออกไปจำหน่ายในตลาดต่างประเทศนั้น จำเป็นต้องมีการผลิตเพื่อให้ได้มาตรฐานตามที่กำหนดไว้ ปัญหาสำคัญที่ทำให้ผลผลิตของหน่อไม้ฝรั่งไม่ได้มาตรฐานส่งออกคือ ศัตรูพืช ซึ่งได้แก่ โรค และวัชพืช แมลงศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และเพลี้ยไฟ โรคพืชที่สำคัญได้แก่ โรคต้นไหม้ ใบเทียมร่วง และโรคแอนแทรคโนส ส่วนวัชพืชที่สำคัญ คือ แห้วหมู เกษตรกรมีการพ่นสารฆ่าแมลงผสมกับสารกำจัดโรคพืชเป็นประจำ เพื่อป้องกันกำจัดศัตรูดังกล่าวจากการสำรวจในปี 2538 - 2539 พบว่า เกษตรกรมีการใช้สารฆ่าแมลง 8 กลุ่มสาร และนิยมใช้

สารฆ่าแมลงในกลุ่ม Organophos phate มากที่สุด คือ 21.10% รองลงมาได้แก่ Carbamate 18.40% พบเกษตรกรมีการใช้สารฆ่าแมลงมีพิษร้ายแรงสูง 16.71% มีพิษร้ายแรง 31.00% พิษปานกลาง 33.33% พิษน้อย 2.40% ส่วนสารกำจัดโรคพืช พบเกษตรกรใช้สารพวก carbendazim , mancozeb , propineb , metalaxyl , captan , copper – oxychloride เป็นต้น ด้วยช่วงพ่น 7 – 10 วันครั้ง (ปิยรัตน์ และคณะ 2540) จากปัญหาดังกล่าวข้างต้นทางกลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักฯ กองกีฏและสัตววิทยา จึงได้ทำการทดสอบการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสานจากผลการทดสอบปี 2541 (ปิยรัตน์ และคณะ, 2541) พบว่าวิธี IPC สามารถลดการใช้สารฆ่าแมลงในแต่ละครั้งลงได้ 40% และลดจำนวนครั้งในการใช้สารเคมีได้อีกมากกว่า 20% ด้วยวิธีการใช้ทางเลือกอื่นทดแทนการใช้สารเคมีเน้นการใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น ไวรัส NPV และ Bt. เป็นต้น ทั้งนี้จะทำการใช้สารดังกล่าวเมื่อแมลงศัตรูสูงเกินระดับเศรษฐกิจ และมีการใช้เทคนิคการพ่นสารด้วยการปรับหัวฉีดเป็นละอองฝอย ซึ่งสามารถลดอัตราการพ่นสารต่อไร่ลงได้วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ให้ผลตอบแทนต่อไร่สูงกว่าวิธีเกษตรกรและมีผลดีต่อสภาพแวดล้อม พบแตนเบียนหนอน Microplitis manilae ตลอดการทดสอบด้วยเปอร์เซ็นต์ การทำลายระหว่าง 37.67 – 53.62%

แต่เนื่องจากปัญหาการผลิตหน่อไม้ฝรั่งนอกจากแมลงศัตรูพืชแล้วปัญหาที่สำคัญที่พบระบาดเป็นประจำได้แก่ โรคพืช และบางพื้นที่พบปัญหาเกี่ยวกับวัชพืช ได้แก่ แห้วหมู หญ้าตีนติด ผักโขม ผักเบี้ยหิน หญ้านกสีชมพู ฯลฯ ซึ่งปัญหาดังกล่าวได้มีผลงานวิจัยรองรับอยู่แล้ว เพียงแต่ไม่ได้นำมาทดสอบร่วมกัน ดังนั้นตั้งแต่ปี 2543 ทางกรมวิชาการเกษตร จึงมีนโยบายเร่งรัดการดำเนินงานพัฒนารูปแบบผสมผสานวิธีต่าง ๆ ในการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรเพื่อนำไปขยายผลโดยนำผลงานวิจัยด้านอารักขาพืช และด้านวิเคราะห์วิจัยสารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร จัดทำเป็นชุดของเทคโนโลยีเพื่อทำการทดสอบร่วมกัน จากผลงานปี 2544 และ 2545 พบว่าวิธีทดสอบชุดเทคโนโลยี การป้องกันกำจัดแบบผสมผสานสามารถลดปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงได้ 18.75 และ 30.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (พิมลพร และคณะ 2544 และ 2545) มีการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ปลอดภัยกว่า และได้ผลคุ้มค่าต่อการลงทุน ดังนั้นในปี 2546 จึงทำการทดสอบเพื่อยืนยันผลการทดสอบสำหรับการขยายผลต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แปลงหน่อไม้ฝรั่ง จำนวน 4 แปลง
- เชื้อไวรัส NPV หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก
- เชื้อ Bt. (Centari 3%WDG) และ Bt. (แบคโทสปิน)
- สารกำจัดโรคพืช benomyl / (Benlate OD 50% WP) , prochloraz (Octave 50% WP) copper oxychloride (Cupravit 85% WP)
- กาวกินริว
- ถุงพลาสติก
- สารจับใบ กรีนพลัส

- ปุ๋ยสูตร 14 – 9 – 20 , 13 – 13 – 21 และปุ๋ยอินทรีย์
- เครื่องยนต์พ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ
- กล้องจุลทรรศน์, กล่องพลาสติก, ป้ายปักแปลง

เวลาและสถานที่

เวลา พฤศภาคม - สิงหาคม 2545

สถานที่ แปลงเกษตรกร ตำบลสนามแย้ อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี

1. คุณกุศลิน เปรมศักดิ์ (วิธีทดสอบแบบผสมผสาน)
2. คุณอนุ มีคำ (วิธีการของเกษตรกร)

วิธีการ

ทำการทดสอบในแปลงหน่อไม้ฝรั่งจากเกษตรกร 2 ราย เป็นแปลงวิธีผสมผสาน 2 ราย เป็นทดสอบแบบวิธีผสมผสาน (IPM) 1 ราย และแปลงตามกรรมวิธีของเกษตรกร 1 ราย ซึ่งมีวิธีการดำเนินงานดังนี้

<u>วิธีผสมผสาน (IPM)</u>

- ใช้ปุ๋ยสูตร 14 – 9 – 20 ผสม 13 – 13 – 21 อัตรา 25 + 25 ก.ก./ไร่ จำนวน 2 ครั้ง และ 14 – 9 – 20 อัตรา 50 ก.ก./ไร่ จำนวน 3 ครั้ง โดยใส่ทุก 15 วันครั้ง ให้ปุ๋ยทางใบสูตร 6 – 20 – 30 อัตรา 100 กรัม/ไร่ จำนวน 7 ครั้ง โดยใส่ทุก 7 วัน ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ อัตรา 30 ก.ก./ไร่ จำนวน 5 ครั้ง ทุก 7 –10 วันครั้ง
- ติดตั้งกับดักสีเหลือง อัตรา 80 กับดัก/ไร่ เปลี่ยนกาวเหนียว ทุก 15 วันครั้ง ทำการตรวจนับแมลงศัตรูพืช และแตนเบียนศัตรูธรรมชาติ โดยสุ่มจากกับดักจำนวน 10 กับดัก/ไร่/ครั้ง จำนวน 5 ครั้ง
- สำรวจแตนเบียนศัตรูธรรมชาติของหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผัก ทุก 7 วันครั้ง
- พ่นสารกำจัดโรคพืช benomyl , prochloraz , copper oxychloride อัตรา 20 , 30 , 30 กรัม /น้ำ 20 ลิตร โดยทำการพ่นสาร ทุก 7 วันครั้ง เพื่อป้องกำจัดโรคไหม้ ใบเทียมร่วง และแอนแทรคโนส
- การพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ใช้เครื่องพ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ (ลากสาย) ใช้อัตราการพ่นสารประมาณ 80 ลิตร / ไร่ ระยะแนวพ่นกว้าง 2-3 เมตร ตามขนาดของต้นพืช
- กำจัดวัชพืชโดยวิธีการถอนเดือนละครั้ง

<u>วิธีการของเกษตรกร</u> เกษตรกรเป็นผู้ดูแลเองทั้งหมด

- ใช้ปุ๋ยสูตร 14 – 10 – 20, 15 – 5 – 15, 13 – 13 – 21 และ 16 – 8 – 8 ทุก 7 – 10 วัน ครั้ง
- พ่นสารกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยพ่นติดต่อกันทุก 7 – 10 วันครั้ง ด้วยสารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ abamectin , สมุนไพรสุดเดช, สมุนไพรน้ำเพชร
- พ่นสารกำจัดโรคพืช 1 ชนิด copper oxchloride

การบันทึกข้อมูล

บันทึกชนิดและจำนวนประชากรของแมลงศัตรูพืชและแตนเบียนศัตรูธรรมชาติบนพืช ชนิดวัชพืช และโรคพืช ชนิดของสารกำจัดศัตรูพืช และอัตราการใช้น้ำ น้ำหนักและราคาของผลผลิตต้นทุนการผลิต และการตรวจวิเคราะห์พิษตกค้างในผลผลิตทั้งในวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกร

ผลการดำเนินการ

จากการตรวจนับชนิดของศัตรูพืชบนหน่อไม้ฝรั่งทุก 7 วัน (ตารางที่ 1) พบแมลงศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม,หนอนกระทู้ผัก และเพลี้ยไฟ โรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ โรคต้นไหม้,ใบเทียมร่วง และแอนแทรคโนส วัชพืช 7 ชนิด ได้แก่ หญ้านกสีชมพู,หญ้าตีนนก,หญ้าดอกขาว ผักโขมหนาม,เบี้ยหิน,หญ้าน้ำนมราชสีห์ และแห้วหมู

จำนวนประชากรหนอนกระทู้หอม ในแปลงทดสอบแบบวิธีผสมผสานที่ 1 (ตารางที่ 2) พบหนอนกระทู้หอมสูงเกินระดับเศรษฐกิจ 1 ครั้ง คือ หนอน 0.01 ตัว/กอ ส่วนวิธีเกษตรกรพบต่ำตลอดการทดลอง ในช่วงเดือนมิถุนายน เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียนหนอน *Microplitis manilae* ซึ่งเป็นแตนเบียนที่สำคัญของหนอนกระทู้หอม (ตารางที่ 3) พบทำลายหนอนกระทู้หอม 53.00 เปอร์เซ็นต์ และ 59.84 เปอร์เซ็นต์ ในวิธีเกษตรกร

จำนวนประชากรเพลี้ยไฟในแปลงทดสอบแบบวิธีผสมผสานที่ และวิธีเกษตรกร (ตารางที่4) ไม่พบประชากรเพลี้ยไฟสูงเกินระดับเศรษฐกิจ จากการตรวจนับ 14 ครั้ง และจากการทดสอบในครั้งนี้พบการระบาดของหนอนกระทู้ผัก (ภาคผนวก 1) ในวิธีผสมผสานพบเพียง 1 ครั้ง ที่สูงเกินระดับเศรษฐกิจ คือ 1.03 ตัว/กอ และได้ทำการพ่นด้วยเชื้อไวรัส NPV ของหนอนกระทู้ผัก

ชนิดและอัตราการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสานที่ (ตารางที่ 5 และ 6) ใช้เชื้อจุลินทรีย์ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้ผัก เพื่อป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผัก 1 ครั้ง และ NPV ของหนอนกระทู้หอม เพื่อป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม 1 ครั้ง รวมพ่นสารฆ่าแมลงและเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด 2 ครั้ง ส่วนวิธีการของเกษตรกร มีการใช้สารฆ่าแมลงและเชื้อจุลินทรีย์เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูหน่อไม้ฝรั่งด้วยสาร 4 ชนิด 11 ครั้ง

ในการป้องกันกำจัดโรคพืช พบว่าในวิธีผสมผสานใช้สารกำจัดโรคพืช 3 ชนิด 10 ครั้ง ส่วนวิธีการของเกษตรกรใช้ 1 ชนิด 10 ครั้ง เพื่อป้องกันกำจัดโรคต้นไหม้ ใบเทียมร่วง และ แอนเทรคโนส ทั้งนี้ใช้อัตราการพ่นสาร 80 ลิตร/ไร่ ทั้งวิธีผสมผสานและวิธีการของเกษตรกร พบว่าวิธีผสมผสานสามารถลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงลงได้ 84 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกร (ตารางที่ 7) และสามารถลดจำนวนครั้งในการพ่นสารฆ่าแมลงลงได้ 81.82 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชที่นำมาทดสอบในวิธีผสมผสาน เป็นสารที่มีพิษน้อย (III) ส่วนวิธีเกษตรกรใช้สารฆ่าแมลงที่มีพิษสูงกว่า คือมีการใช้สารที่มีพิษร้ายแรงยิ่ง (Ia) (ภาคผนวก)

เปรียบเทียบน้ำหนักผลผลิตต่อไร่ (ตารางที่ 8) พบว่าวิธีผสมผสานได้น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด 779.25 ก.ก./ไร่ ส่วนวิธีการของเกษตรกรได้น้ำหนัก 1,185.50 ก.ก./ไร่ และได้ราคาผลผลิตทั้งหมด (ตารางที่ 9) 21,447.37 บาท/ไร่ ในวิธีผสมผสาน ส่วนวิธีการของเกษตรกรได้ราคาผลผลิตทั้งหมด 33,461.00 บาท/ไร่

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตต่อไร่ พบว่าวิธีผสมผสานเสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 9,229.40 บาท/ไร่ ส่วนวิธีการของเกษตรกรต้นทุนการผลิต 9,156.00 บาท/ไร่ เมื่อหักต้นทุนการผลิตแล้ววิธีผสมผสานได้กำไรสุทธิ 12,217.97 บาท/ไร่ ส่วนวิธีการเกษตรกรได้ 24,305.00 บาท/ไร่ พบวิธีผสมผสานได้รับผลตอบแทนต่อการลงทุน คือ 2.45 ส่วนวิธีของเกษตรกร คือ 3.60 (ตารางที่ 10) แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้วิธีผสมผสานได้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าวิธีการของเกษตรกรก็ตาม แต่เมื่อคำนึงถึงวิธีการใช้ พบว่าวิธีผสมผสานเป็นวิธีที่ปลอดภัยกว่า เมื่อตรวจใช้สารฆ่าแมลงแป้งกันกำจัดศัตรูพืช มีพิษน้อยในขณะที่มีวิธีเกษตรกรใช้มีพิษสูงกว่า

สรุปผลการทดลอง

ทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสานเปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกร จังหวัดกาญจนบุรี ปี 2546 พบแมลงศัตรูพืช 3 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และเพลี้ยไฟ โรคพืช 3 ชนิด ได้แก่ โรคพ้นไหม้ ใบเทียมร่วง และแอนแทรคโนส วัชพืช 7 ชนิด ได้แก่ หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนนก หญ้าดอกขาว ผักโขมหนาม เบี้ยหิน หญ้าน้ำนมราชสีห์ และแห้วหมู ในวิธีผสมผสานพบใช้สารกำจัดศัตรูพืช 2 ชนิด 3 ครั้ง ด้วยสารที่มีระดับความเป็นพิษน้อย (III) ส่วนวิธีการของเกษตรกรใช้สารกำจัดศัตรูพืช 4 ชนิด 11 ครั้ง ด้วยสารที่มีระดับความเป็นพิษร้ายแรงยิ่ง (Ia) วิธีผสมผสานพบแตนเบียน *microplitis manilae* 53.00 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธีการของเกษตรกรพบ 59.84 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบแบบวิธีผสมผสานทั้งสองวิธีการสามารถลดจำนวนครั้งในการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชลงได้ 81.82 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณลงได้อีก 84 เปอร์เซ็นต์ เสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 8,733.40 บาท/ไร่ ได้น้ำหนักผลผลิต/ไร่ 779.25 ก.ก./ไร่ ทำให้ได้กำไรสุทธิ 12,713.97 บาท/ไร่ ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 2.45 ตามลำดับ ส่วนวิธีการของเกษตรกร เสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 9,276.00 บาท/ไร่ ได้น้ำหนักผลผลิต/ไร่ 1,185.50 ก.ก./ไร่ ได้กำไรสุทธิ 24,185.00 บาท/ไร่ ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.60

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกรที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดียิ่งในเรื่องแปลงทดสอบ คุณจาตุรงค์ ฤกษ์สังเกตุ และเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยการใช้สารที่ช่วยเรื่องเทคนิคการพ่นสาร คุณสุมณฑา ธีระชีพ คุณนงลักษณ์ ขันตี คุณสิริรัตน์ อิ่มเชิง คุณหับสะ ตงเยต คุณจันทรา ช้างจีน เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักฯที่ช่วยรวบรวมข้อมูล และคุณสุนทร บุญพิทักษ์ ที่ช่วยพิมพ์ผลงานวิจัยจนทำให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กมล เลิศรัตน์. อรสา ดิสถาพร สุขาดา เตชะวงค์เสถียร และวีระ ภาคอุทัย . 2544. รายงานการประมวลองค์ความรู้เรื่องผักในประเทศ สถานภาพของการผลิต การตลาด และการวิจัย . สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ 190 น.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข จักรพงศ์ พิริยพล สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น และลัดดาวัลย์ งามวงศ์ธรรม .2540.การสำรวจการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งในเอกสารการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน , กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 257-262.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น อุราพร ใจเพ็ชร อุทัย เกตนุติ อัจฉรา ตันติโชดก ศิริณี พูนไชยศรี และไพศาล รัตนเสถียร .2541. ทดสอบป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน ในรายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ประจำปี 2541. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.36 - 52.

พิมลพร นันทะ ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง อุราพร ใจเพ็ชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รวมชัยอภิกุล อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก รัตนา นชะพงษ์ ไพศาล รัตนเสถียร จีรนุช เอกอำนวย นิยมรัฐ ไตรศรี จุมพล สาระนาค สุปราณี อิ่มพิทักษ์

ธีรพล อุ่นวิจิตต์วรรธนะ จินตนา ภู่มงกำชัย เสริมศิริ คงแสงดาว มัณฑนา มิลล์. 2544. ทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน . กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 130 – 131.

พิมลพร นันทะ ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง อุราพร หนูนารถ ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รวมชัยอภิกุล อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก รัตนา นชะพงษ์ ไพศาล รัตนเสถียร จีรนุช เอกอำนวย นิยมรัฐ ไตรศรี จุมพล สาระนาค สุปราณี อิ่มพิทักษ์ ธีรพล อุ่นจิตต์วรรธนะ จินตนา ภู่มงกุฎชัย เสริมศิริ คงแสงดาว มัณฑนา มิลล์ . 2545. ทดสอบการป้องกันกำจัดศัตรูหน่อไม้ฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ตารางที่ 1 ชนิดของแมลงศัตรูที่สำคัญและแมลงศัตรูธรรมชาติ หน่อไม้ฝรั่งในวิธผสมผสานและวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม - สิงหาคม 2546

ชนิดศัตรูพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	แมลงศัตรูธรรมชาติ
แมลงศัตรูพืช		
1. หนอนกระทู้หอม (Beet army worm)	*Spodoptera exigua* (Hubner)	*Microplitis manilae*
2. หนอนกระทู้ผัก (Common Cutworm)	*Spodoptera litura* (Fabricius)	*Microplitis manilae*
3. หนอนเจาะสมอฝ้าย (Cotton bollworm)	*Helicoverpa armigera* (Hubner)	-
4. เพลี้ยไฟ (Onion Thrips)	*Thrips tabaci* (Linderman)	-
โรคพืช		
1. ต้นไหม้ (Stem blight)	*Phomopsis asparagi*	
2. ใบเทียมร่วง (Cercospora blight)	*Cercospora asparagi*	
3. แอนแทรคโนส (Anthraenose)	*Colletotrichum gleosporicidez*	
วัชพืช		
1. หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa cdonum* (L.) (Link)	
2. หญ้าตีนนก	*Diaitarai sanquinalis* (L.) Scop.	
3. หญ้าดอกขาว	*Leptochloa chinensis* (L.) Nees.	
4. ผักโขมหนาม	*Amaranthus spinosus* Linn.	
5. เบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrun* Linn.	
6.หญ้าน้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* Linn.	
7.แห้วหมู	*Cyperus rotundus* Linn.	

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนประชากรของหนอนกระทู้หอมต่อกอบนหน่อไม้ฝรั่ง ในวิธีผสมผสานและวิธีการของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

วันที่ตรวจนับ	จำนวนหนอนกระทู้หอม/กอ			
	วิธีผสมผสาน		วิธีเกษตรกร	
	ไข่	หนอน	ไข่	หนอน
22 พ.ค. 46	0.14	0.45	0.04	0.09
3 มิ.ย. 46	0.12	1.01*	0.03	0.74
10 มิ.ย. 46	0.08	0.9	0.10	0.34
17 มิ.ย. 46	0.02	0.2	0.04	0.21
24 มิ.ย. 46	0	0	0.02	0.03
30 มิ.ย. 46	0	0.08	0	0
7 ก.ค. 46	0.02	0.42	0	0
15 ก.ค. 46	0	0.08	0	0.01
21 ก.ค. 46	0	0.05	0	0.05
29 ก.ค. 46	0.01	0.02	0	0
6 ส.ค. 46	0	0.11	0	0.01
14 ส.ค. 46	0	0.05	0	0.01
18 ส.ค. 46	0	0.05	0	0.04
26 ส.ค. 46	0.01	0.02	0	0.04

* สูงเกินระดับเศรษฐกิจ (ET)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ การทำลายของแตนเบียนหนอน (*Microplitis manilae*) ของหนอนกระทู้หอมบนหน่อไม้ฝรั่งในวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม - สิงหาคม 2546

วันที่ตรวจนับ	เปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียนหนอน	
	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
22 พ.ค. 46	63.11	66.67
3 มิ.ย. 46	36.07	31.48
10 มิ.ย. 46	45.78	56.96
17 มิ.ย. 46	0.00	64.41
24 มิ.ย. 46	100.00	93.75
30 มิ.ย. 46	0.00	100.00
7 ก.ค. 46	12.50	100.00
15 ก.ค. 46	50.00	98.15
21 ก.ค. 46	44.44	92.96
29 ก.ค. 46	88.23	100.00
6 ส.ค. 46	59.26	0.00
14 ส.ค. 46	61.54	0.00
18 ส.ค. 46	85.29	0.00
26 ส.ค. 46	95.83	33.33
ค่าเฉลี่ย	**53.00**	**59.84**

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนประชากรเพลี้ยไฟต่อกอบนหน่อไม้ฝรั่งในการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน และวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

วันที่ตรวจนับ	จำนวนเพลี้ยไฟ / กอ	
	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
22 พ.ค. 46	2.13	3.25
3 มิ.ย. 46	1.75	3.95
10 มิ.ย. 46	18.40	2.30
17 มิ.ย. 46	-	1.00
24 มิ.ย. 46	-	0.60
30 มิ.ย. 46	7.20	0.65
7 ก.ค. 46	11.95	0.05
15 ก.ค. 46	1.95	0.02
21 ก.ค. 46	1.97	0.00
29 ก.ค. 46	0.13	0.00
6 ส.ค. 46	0.93	-
14 ส.ค. 46	3.37	0.45
18 ส.ค. 46	9.50	1.70
26 ส.ค. 46	-	-
ค่าเฉลี่ย	**5.39**	**1.16**
สูงกว่าระดับเศรษฐกิจ (ครั้ง)	**0**	**0**

- ไม่ได้ทำการตรวจนับเนื่องจากอยู่ระหว่างการพักต้น และฝนตก

ตารางที่ 5 ชนิดและอัตราของสารกำจัดศัตรูพืชในการป้องกันกำจัด โดยวิธีผสมผสาน กับวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

วิธีผสมผสาน		วิธีเกษตรกร	
สารกำจัดศัตรูพืช	อัตรา มล.ก/น้ำ 80 ลิตร/ไร่	สารกำจัดศัตรูพืช	อัตรา มล.ก/น้ำ 80 ลิตร/ไร่
เชื้อจุลินทรีย์ [1/]		เชื้อจุลินทรีย์	
NPV (หนอนกระทู้หอม)	120	Bt (บีที-ทีเอฟ-เอ)	200
NPV (หนอนกระทู้ผัก)	120		
สารฆ่าแมลง		สารฆ่าแมลง	
-		abamectin (1.8% EC)	60
		สมุนไพรสุดเดช	200
		สมุนไพรน้ำเพชร	200
สารกำจัดโรคพืช [1/]		สารกำจัดโรคพืช	
copper oxychloride 85%WP	120	copper oxychloride 85%WP	80
benomyl 50% WP	80		
prochloraz 50% WP	120		
กาวเหนียว (มล./80 กับดัก/ไร่)			
- คินริว (ใช้ 5 มล./ 1 กับดัก)			

[1/] ผสมสารจับใบกรีนพลัส

ตารางที่ 6 ชนิดและจำนวนครั้งในการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ในแปลงหน่อไม้ฝรั่งระหว่างวิธีผสมผสานและวิธีเกษตร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

ชนิดและจำนวนครั้งในการพ่นสารกำจัดศัตรูพืช (ชนิด / ครั้ง)	
วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
เชื้อจุลินทรีย์	เชื้อจุลินทรีย์
NPV (หนอนกระทู้หอม)/1	Bt (บีที-ทีเอฟ-เอ)/1
NPV (หนอนกระทู้ผัก) /1	
สารฆ่าแมลง	สารฆ่าแมลง
-	abamectin /5
	สมุนไพรสุดเดช /2
	สมุนไพรน้ำเพชร /2
รวม 2 ชนิด 2 ครั้ง	4 ชนิด 11 ครั้ง
สารกำจัดโรคพืช [1/]	สารกำจัดโรคพืช
copper oxychloride /6	copper oxychloride /10
benomyl /2	
prochloraz /2	
รวม 3 ชนิด 10 ครั้ง	1 ชนิด 10 ครั้ง

ตารางที่ 7 ปริมาณการใช้สารฆ่าแมลง อัตราการพ่นสารต่อไร่ จำนวนครั้งในการพ่นสารและเปอร์เซ็นต์ลดการใช้สารระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี
พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
1. ปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (ลิตร,ก.ก/ไร่)	0.24	1.50
ลดปริมาณการใช้สารลงได้ (%)	84	
2. อัตราการพ่นสาร (ลิตร/ไร่)	80.00	80.00
ลดการใช้สารในแต่ละครั้ง (%)	0	
3. จำนวนพ่นสารฆ่าแมลง (ครั้ง)	2	11
ลดจำนวนครั้งในการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (%)	81.82	
4. พิษตกค้าง (ppm)		
abamectin	ไม่ได้ใช้	-

- หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์พิษตกค้าง

ตารางที่ 8 น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด น้ำหนักผลผลิตได้มาตรฐานส่งออก และไม่ได้มาตรฐานส่งออกต่อไร่ ในการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสานกับวิธีเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัด กาญจนบุรี

พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด (ก.ก/ไร่)	779.25	1,185.50
น้ำหนักผลผลิตได้มาตรฐาน (ก.ก/ไร่)	560.44	932.30
น้ำหนักผลผลิตเกรด A เขียว	178.95	285.40
น้ำหนักผลผลิตเกรด A ตูม	148.25	214.30
น้ำหนักผลผลิตเกรด B ตูม	156.18	249.60
น้ำหนักผลผลิตเกรด C ตูม	77.06	183.00
น้ำหนักผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน (ก.ก/ไร่)	218.82	253.20
น้ำหนักผลผลิตเกรด A ตกเกรด	85.66	88.10
น้ำหนักผลผลิตเกรด B ตกเกรด	53.60	66.70
น้ำหนักผลผลิตเกรด C ตกเกรด	28.60	45.10
น้ำหนักผลผลิตฝอย	50.96	53.30

* คำนวณจากการเก็บผลผลิต 45 วัน

ตารางที่ 9 ราคาผลผลิตทั้งหมด ราคาผลผลิตได้มาตรฐานส่งออก และไม่ได้มาตรฐานส่งออกต่อไร่ ในการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน กับวิธีเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

	วิธีผสมผสาน 1	วิธีเกษตรกร
ราคาผลผลิตทั้งหมด (บาท/ไร่)	**21,447.37**	**33,461.00**
ราคาผลผลิตได้มาตรฐาน (บาท/ไร่)	19,003.90	30,687.30
ราคาผลผลิตเกรด A เขียว (บาท/ไร่)	6,444.08	12,843.00
ราคาผลผลิตเกรด A ตูม (บาท/ไร่)	3,828.51	7,500.50
ราคาผลผลิตเกรด B ตูม (บาท/ไร่)	2,738.60	6,988.80
ราคาผลผลิตเกรด C ตูม (บาท/ไร่)	697.89	3,355.00
ราคาผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน (บาท/ไร่)	2,443.73	2,773.70
ราคาผลผลิตเกรด A ตกเกรด (บาท/ไร่)	1,082.63	1,497.70
ราคาผลผลิตเกรด B ตกเกรด (บาท/ไร่)	458.95	800.40
ราคาผลผลิตเกรด C ตกเกรด (บาท/ไร่)	105.92	315.70
ราคาผลผลิตฝอย (ตกเกรด) (บาท/ไร่)	97.63	159.90

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต รายได้สุทธิ ตลอดจนผลตอบแทนต่อการลงทุนระหว่างการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี
พฤษภาคม – สิงหาคม 2546

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
1.ต้นทุนการผลิต (C) บาท/ไร่		
- ค่าสารกำจัดแมลงศัตรูพืช	480	710
- ค่าสารกำจัดโรคพืช	590.40	96
- ค่าจ้างพ่นสาร [1/]	600	660
- ค่ากาวเหนียว [2/]	560	-
- ค่ากระป๋องเหลือง	40	-
- ค่าเก็บผลผลิต	2,700	2,700
- ค่าปุ๋ย	3,763	5,110
รวมต้นทุนการผลิต (C)	8,733.40	9,276.00
ราคาผลผลิต (R) บาท/ไร่	21,447.37	33,461.00
รายได้สุทธิ (บาท/ไร่)	12,713.97	24,185.00
ผลตอบแทนต่อการลงทุน (R/C)	**2.45**	**3.60**

[1/] ค่าพ่นสารครั้งละ 60 บาท/ไร่

[2/] คำนวณจากราคากาวเหนียว 280 บาท/ลิตร (ใช้กาวเหนียว 5 ครั้งๆ ละ 400 ซีซี)

ภาคผนวก 1

จำนวนประชากรของหนอนกระทู้ผัก/กอ บนหน่อไม้ฝรั่งในวิธีผสมผสาน และวิธีของเกษตรกร อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ปี 2546

ครั้งที่ตรวจนับ	จำนวนหนอนกระทู้ผัก /กอ	
	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
1	0.23	0.03
2	0.00	0.05
3	0.20	0.35
4	0.27	0.27
5	0.01	0.09
6	0.00	0.05
7	0.05	0.05
8	0.38	0.56
9	0.06	0.04
10	0.02	0.02
11	0.29	0.03
12	1.03*	0.01
13	0.38	0.31
14	0.12	0.04

* สูงเกินระดับเศรษฐกิจ

- ไม่ได้ทำการตรวจนับเนื่องจากพักต้น

ภาคผนวก 2

ชนิดสารกำจัดศัตรูพืช	ระดับความเป็นพิษ	ราคาจำหน่าย/ มล.ลิตร/กก.
เชื้อจุลินทรีย์		
NPV (หนอนกระทู้หอม)	-	2,000
NPV (หนอนกระทู้ผัก)	-	2,000
Bt. (บีที-ทีเอฟ-เอ)		
สารฆ่าแมลง		
abamectin (อะบาเม็กติน 1.8% EC)	Ia	1,300
สมุนไพรสุดเดช (สมุนไพรกำจัดแมลง)		
สมุนไพรน้ำเพชร (สมุนไพรกำจัดแมลง)		
สารกำจัดโรคพืช		
copper oxychloride (Cupravit 85% WP)	III	160
benomyl (Benlate OD 50% WP)	III	900
prochloraz (Octave 50% WP)	III	1380
copper oxychloride (ดูปร๊อกซ์ 85% WP)	III	120
อื่นๆ		
กรีนพลัส	-	195
ปุ๋ย + อาหารเสริม		บาท / 50 ก.ก.
14 – 9 – 20	-	580
13 – 13 - 21	-	480
14 – 10 - 20	-	430
15 – 15 - 15	-	450
16 – 8 - 8	-	330
ปุ๋ยลูกศร (ชีวภาพ)	-	330
ปุ๋ยอินทรีย์ชีวภาพ	-	300
ปุ๋ยเกร็ด 20 – 20 – 20	-	50 บาท/ก.ก.
อาหารบำรุงชีวภาพ	-	200 บาท/ลิตร
ปุ๋ยเกร็ด 6 – 20 - 30	-	90 บาท/ก.ก.

ชนิดสารกำจัดศัตรูพืช	ระดับความเป็นพิษ	ราคาจำหน่าย
ปุ๋ยทางใบ	-	200 บาท/ลิตร
ปุ๋ยเกล็ด 25 – 5 – 5	-	25 บาท/ก.ก.
ปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพ (ไวต้า)	-	200 บาท/ลิตร
บูมไรซ์ (อาหารเสริม)	-	230 บาท/ลิตร

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำดอกโดยวิธีผสมผสาน

Integrated Insect Pest Control on Cauliflower

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข จักรพงศ์ พิริยพล
สมรวย รวมชัยอภิกุล อุทัย เกตุนุติ
ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย จันทร์ทิพย์ ธำรงศรีสกุล
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำดอกโดยวิธีผสมผสาน ดำเนินการในแปลงเกษตรกร 2 ราย ระหว่างเดือน ธันวาคม 2545 – เมษายน 2546 เปรียบเทียบการทดสอบโดยวิธีผสมผสานกับวิธีการของเกษตรกร ที่ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดและจำนวนศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติ ชนิดของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอัตราการใช้ น้ำหนักและราคาผลผลิต ต้นทุนการผลิต ตลอดจนพิษตกค้างในผลผลิต โดยวิธีผสมผสานใช้ระดับเศรษฐกิจ กับดักกาวเหนียวสีเหลือง เชื้อจุลินทรีย์ และสารฆ่าแมลงเปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกร

จากการตรวจนับแมลงศัตรูกะหล่ำดอกทุก 3 - 4 วันครั้ง รวม 12 ครั้ง ในแปลงทดสอบแบบวิธีผสมผสานพบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิดได้แก่ หนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนคืบกะหล่ำ โดยพบหนอนใยผักสูงเกินระดับเศรษฐกิจ 10 ครั้ง หนอนกระทู้ผักระบาดสูงเกินระดับเศรษฐกิจ 6 ครั้ง หนอนกระทู้หอมพบระบาดสูงเกินระดับเศรษฐกิจ 1 ครั้ง ส่วนด้วงหมัดผัก และหนอนคืบกะหล่ำ พบต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจตลอดฤดูปลูก ทำการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ 1 ชนิด คือ Bt. (Florbac FC) จำนวน 5 ครั้ง และสารฆ่าแมลง 1 ชนิด ได้แก่ chlorfenapyr 10% SC จำนวน 4 ครั้ง รวมพ่น 9 ครั้ง ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่ ส่วนวิธีของเกษตรกรพ่นสารฆ่าแมลง 5 ชนิด ได้แก่ chlorfenapyr 10% SC, fipronil 5 % SC , abamectin 1.8 % EC , cypermethrin 35 % EC , และ spinosad 12 % SC จำนวน 6 ครั้ง ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่

ในแปลงทดสอบวิธีผสมผสานพบมีการใช้สารฆ่าแมลงที่มีความเป็นพิษปานกลาง (II) ส่วนวิธีเกษตรกรใช้สารที่มีระดับความเป็นพิษน้อย (III) -พิษร้ายแรงมาก (Ia) ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำที่สำคัญ

รหัสโครงการวิจัย 45 06 006 021

การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช พบว่าวิธีผสมผสานลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงลงได้ 73.33 เปอร์เซ็นต์ ได้น้ำหนักหัวดีที่มีคุณภาพเพิ่มขึ้น 31.35 เปอร์เซ็นต์ และราคาผลผลิตเพิ่มขึ้น 28.26 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในผลผลิต

ต้นทุนการผลิต ราคาผลผลิต รายได้สุทธิ และผลตอบแทนต่อการลงทุนต่อไร่ ในแปลงทดสอบวิธีผสมผสานเสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 9,382.00 บาท ได้ราคาผลผลิต 45,606.00 บาท ทำให้ได้กำไรสุทธิ 36,224.00 บาท และผลตอบแทนต่อการลงทุน 4.86 ส่วนวิธีของเกษตรกร เสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 10,820.00 บาท ได้กำไรสุทธิ 21,900.00 บาท และได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.02

คำนำ

กะหล่ำดอกเป็นพืชผักตระกูลกะหล่ำ ส่วนใหญ่ใช้บริโภคในประเทศและมีการส่งออกเล็กน้อยจากข้อมูลของ กมลและคณะ 2544 รายงานว่า ปัจจุบันมีพื้นที่ปลูกจำนวน 19,151 ไร่ มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกกะหล่ำดอกในปี 2541 มีประมาณ 46 ตัน คิดเป็นมูลค่า 0.70 ล้านบาท แมลงศัตรูที่สำคัญได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม หนอนคืบกะหล่ำ หนอนเจาะยอด แมลงวันหนอนชอนใบ และด้วงหมัดผักเข้าทำลายทุกระยะของการเจริญเติบโต (ปิยรัตน์และคณะ,2542) ดังนั้น จึงหลีกเลี่ยงสภาพการใช้สารฆ่าแมลง โดยเฉพาะสารเคมีได้ยากยิ่ง เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้สารเคมีอย่างถูกต้องและน้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น จึงต้องใช้วิธีการป้องกันกำจัดแบบผสมผสาน เช่น การใช้กับดักแมลง หรือวิธีการสุ่มตรวจนับ ระดับเศรษฐกิจ การใช้เชื้อจุลินทรีย์และสารฆ่าแมลง เป็นต้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เมล็ดพันธุ์กะหล่ำดอก
- เชื้อจุลินทรีย์ Bt. (Florbac FC)
- สารฆ่าแมลง chlorfenapyr (Rampage 10%SC)
- สารกำจัดโรคพืช iprodione (Rovral 50% WP) ,metalaxyl (Metalaxyl 35% SD)
- กาวเหนียวคินริว
- กับดักสีเหลือง (กระป๋องน้ำมันเครื่องที่ใช้แล้วขนาด 1 ลิตร)
- สารจับใบ Foil
- ปุ๋ยสูตร 25-7-7 , 16-16-16
- ธาตุอาหารรอง Ca + Bo (Beplus)
- เครื่องยนต์พ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ

วิธีการ

ทำการทดสอบในแปลงกะหล่ำดอกขนาด 2 ไร่ จากเกษตรกร 2 ราย เป็นแปลงทดสอบแบบวิธีผสมผสาน 1 แปลง และแปลงเปรียบเทียบซึ่งเป็นวิธีการของเกษตรกร 1 แปลง ดังนี้

<u>แปลงทดสอบวิธีผสมผสาน</u>

- เตรียมแปลงทดสอบจำนวน 1 แปลง โดยการไถคราด ตากดินไว้ 7 วัน
- ทำการติดตั้งกับดักกาวเหนียวสีเหลือง อัตรา 80 กับดัก/ไร่ (ระยะ 4x5 เมตร) โดยให้กับดักสูงจากพื้นดิน 30 ซม. ทากาวเหนียวใหม่ทุก 2 สัปดาห์
- ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 25-7-7 หลังปลูก 14 วัน อัตรา 100 กก./ไร่ และ 16-16-16 หลังปลูก 40 วัน อัตรา 100 กก./ไร่
- หลังปลูกพืช 7 วัน สำรวจหนอนใยผัก โดยการสุ่มแบบซีเควนเชียล ทุก 3-4 วัน ดังตารางสำรวจ ทำการพ่นเชื้อจุลินทรีย์ Bt. (Florbac FC) อัตรา 250 มล./ไร่ chlorfenapyr อัตรา 100 มล./ไร่ เมื่อแมลงศัตรูสูงเกินระดับเศรษฐกิจ และในช่วงก่อนเก็บเกี่ยวผลผลิต 2 สัปดาห์ ให้ใช้เฉพาะเชื้อ Bt.

ตารางสำรวจปริมาณหนอนใยผักแบบซีเควนเชียลในกะหล่ำดอก อายุ 1 – 35 วัน ต่อพื้นที่ 1 ไร่ (วินัยและคณะ, 2540)

จำนวนต้นที่ตรวจนับ	จำนวนหนอนใยผักตัวต่อต้น	หมายเหตุ
1-40	>13	- เมื่อพบจำนวนหนอนใยผักมากกว่าจำนวนที่กำหนดในแต่ละช่วงจำนวนต้นที่ตรวจนับให้พ่นสารฆ่าแมลง
1-50	>15	
1-60	>16	
1-70	>18	
1-80	>20	
1-90	>22	
1-100	>24	

- ทำการสำรวจแมลงศัตรูอื่น ๆ ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนคืบกะหล่ำ จากกะหล่ำดอก 100 ต้น/ไร่ ในกรณีที่พบการระบาดของหนอนสูงเกิน 0.1 ตัว/ต้น (ตลอดอายุพืช) ให้พ่นด้วยเชื้อจุลินทรีย์ Bt.(Florbac FC) อัตรา 250 มล./ไร่ หรือ chlorfenapyr อัตรา 100 มล./ไร่
- เมื่อพืชอายุ 2 สัปดาห์ พ่นด้วย Ca+Bo ทุก 7 วัน เพื่อลดการระบาดของโรคเน่าเละ
- การพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ใช้เครื่องยนต์พ่นสารแบบใช้แรงดันน้ำ ใช้อัตราการพ่นประมาณ 100 ลิตร/ไร่
- ตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของสารกำจัดศัตรูพืช โดยสุ่มเก็บตัวอย่างกะหล่ำดอกในช่วงระยะเก็บเกี่ยว เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในวิธีผสมผสาน

วิธีเกษตรกร

- ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 25-7-7 หลังปลูก 3 วัน และ 13 วัน อัตรา 50 และ 75 ก.ก/ไร่ ตามลำดับ และ 16-16-16 ใส่หลังปลูก 37 วัน อัตรา 100 กก./ไร่

- เริ่มพ่นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชหลังปลูก 4 วัน ด้วยสาร 5 ชนิด คือ chlorfenapyr fipronil , abamectin , cypermethrin และ spinosad อัตรา 100, 200, 200, 200 และ 100 มล./ไร่ ตามลำดับ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกชนิดและจำนวนประชากรของแมลงศัตรูพืชและแตนเบียนศัตรูธรรมชาติบนพืชและบนกับดักกาวเหนียวสีเหลือง ชนิดวัชพืชและชนิดโรคพืช บันทึกชนิดของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและอัตราการใช้ บันทึกจำนวนหัวดีและหัวเสีย เนื่องจากการทำลายของแมลงศัตรูและโรคพืช น้ำหนักและราคาผลผลิต ต้นทุนการผลิตและปริมาณสารพิษตกค้างในผลผลิต ทั้งในวิธีผสมผสานและวิธีเกษตรกร

เวลาและสถานที่

เวลา ธันวาคม 2545 - เมษายน 2546

สถานที่ แปลงเกษตรกรตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี 2 ราย

- แปลงคุณเลิศ สิงห์สังข์ (วิธีผสมผสานขนาด 1 ไร่)
- แปลงคุณสมปอง สิงห์สังข์ (วิธีเกษตรกรขนาด 1 ไร่)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

พบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิด ได้แก่ หนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนคืบกะหล่ำ พบโรคพืช 1 ชนิด ได้แก่ ราน้ำค้าง พบวัชพืช 2 ชนิด ได้แก่ ผักเบี้ยหิน และแห้วหมู (ตารางที่ 1)

ในวิธีผสมผสานพบหนอนใยผักสูงเกินระดับเศรษฐกิจ 10 ครั้ง ระหว่าง 0.27-1.78 ตัว/ต้น พบหนอนกระทู้หอม 1 ครั้ง 0.18 ตัว/ต้น หนอนกระทู้ผักพบพบ 6 ครั้ง ระหว่าง 0.14-2.85 และพบด้วงหมัดผักหนอนคืบกะหล่ำต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจตลอดการทดลอง (ตารางที่ 2)

ศัตรูธรรมชาติ พบแตนเบียนของหนอนใยผักเป็นชนิด แตนเบียนหนอน (*Cotesia plutellae*) ทั้งวิธีผสมผสานและวิธีเกษตรกร เฉลี่ย 10.93 และ 2.45 เปอร์เซ็นต์ และแตนเบียนหนอนของหนอนกระทู้หอม / หนอนกระทู้ผัก ชนิด *Microplitis manilae* พบในแปลงทดสอบวิธีผสมผสานและวิธีการของเกษตรกรเฉลี่ย 1.90 และ 0.21 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) และตรวจพบตัวเต็มวัยของแตนเบียนหนอนดังกล่าวบนกับดักกาวเหนียวสีเหลืองมีปริมาณต่ำมาก คือ แตนเบียน *Microplitis manilae* เฉลี่ย 0.04 ตัว/กับดัก นอกจากนี้ยังพบ

แตนเบียนศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูกะหล่ำดอกเป็นแตนเบียนชนิด แมลงวันก้นขน 0.70 ตัว/กับดัก ในขณะเดียวกันพบแมลงศัตรูกะหล่ำดอกที่สำคัญ ได้แก่ หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก ติดบนกับดักเฉลี่ย 1.70, 0.01 และ 0.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) จะเห็นได้ว่ากับดักกาวเหนียวสีเหลืองมีประสิทธิภาพในการดักจับหนอนใยผัก แม้ว่าจะมีแตนเบียนศัตรูธรรมชาติติดบนกับดัก แต่มีผลกระทบน้อย เนื่องจากพบแตนเบียนในปริมาณต่ำมาก เมื่อพิจารณาแตนเบียนศัตรูธรรมชาติจากการสำรวจบนต้นพืชในวิธีผสมผสานซึ่งมีการใช้กับดักกาวเหนียว พบการทำลายของแตนเบียนหนอนต่ำกว่าวิธีของเกษตรกรที่ไม่ได้ทำการติดตั้งกับดักเพียงเล็กน้อย

จำนวนชนิดและอัตราการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูกะหล่ำดอกโดยวิธีผสมผสานมีการใช้สารฆ่าแมลง 1 ชนิด chlorfenapyr และ จุลินทรีย์ 1 ชนิด คือ Bt.(Florbac FC) เพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำดอกด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่ สารกำจัดโรคพืช 1 ชนิด คือ iprodione (ตารางที่ 5) รวมใช้สารฆ่าแมลง 1 ชนิด 4 ครั้ง พ่นเมื่อแมลงสูงเกินระดับเศรษฐกิจ (ตารางที่ 6) ส่วนวิธีการของเกษตรกรมีการใช้สารฆ่าแมลง 5 ชนิด คือ chlorfenapyr, fipronil, abamectin cypermethrin และ spinosad ด้วยอัตราการพ่นสาร 100 ลิตร/ไร่ (ตารางที่ 5) รวมการใช้สารฆ่าแมลง 6 ครั้ง (ตารางที่ 6) พบว่าวิธีผสมผสานสามารถลดปริมาณสารฆ่าแมลงลงได้ 73.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีของเกษตรกร (ตารางที่ 7) เปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของสารฆ่าแมลง พบว่าวิธีผสมผสานใช้สารที่มีพิษน้อย (III) ถึงพิษปานกลาง (II) ส่วนวิธีของเกษตรกรใช้สารที่มีระดับพิษน้อย (III) ถึงพิษร้ายแรงมาก (Ia) จากการตรวจวิเคราะห์พิษตกค้างในผลผลิต ไม่พบพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในวิธีผสมผสาน และวิธีของเกษตรกร

น้ำหนักผลผลิต จำนวนผลผลิต และราคาผลผลิตต่อไร่ (ตารางที่ 8) พบว่าวิธีผสมผสานได้น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด 4,860 กิโลกรัม จำนวนหัวทั้งหมด 8,311 หัว ได้ราคาผลผลิตทั้งหมด 45,606.00 บาท/ไร่ ส่วนวิธีของเกษตรกรได้ราคาผลผลิต 32,720.00 บาท/ไร่ ซึ่งต่ำกว่าวิธีผสมผสานคิดเป็นร้อยละ 28.26 น้ำหนักผลผลิตต่อไร่ที่ได้คุณภาพพบว่า วิธีผสมผสานได้น้ำหนัก 4,361 กิโลกรัม ส่วนวิธีของเกษตรกรได้น้ำหนักผลผลิต 2,994 กิโลกรัม ทำให้ได้น้ำหนักผลผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 31.35 (ตารางที่ 7) เมื่อพิจารณาราคาผลผลิตต่อไร่ พบว่าวิธีผสมผสานได้รับ 45,606.00 บาท ซึ่งสูงกว่าวิธีการของเกษตรกรซึ่งได้รับ 32,720.00 บาท (ตารางที่ 8)

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต รายได้สุทธิ ตลอดจนผลตอบแทนต่อการลงทุนต่อไร่ พบว่าวิธีผสมผสานเสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 9,382.00 บาท เมื่อหักต้นทุนการผลิตแล้วได้กำไรสุทธิ 36,224.00 บาท ทำให้ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 4.86 ส่วนวิธีของเกษตรกรเสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิตสูงกว่าเล็กน้อยคือ 10,820.00 บาท เมื่อหักต้นทุนการผลิตแล้วได้กำไรสุทธิ 21,900.00 บาท และได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.02 ซึ่งต่ำกว่าวิธีผสมผสาน (ตารางที่ 9)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำดอกโดยวิธีผสมผสาน เปรียบเทียบกับวิธีการของเกษตรกร ที่อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี พ .ศ. 2545 พบแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ 5 ชนิด ได้แก่ หนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนคืบกะหล่ำ ในวิธีผสมผสานใช้สารฆ่าแมลง 1 ชนิด และเชื้อจุลินทรีย์ 1 ชนิด จำนวน 9 ครั้ง ส่วนวิธีเกษตรกรใช้สารฆ่าแมลง 5 ชนิด จำนวน 6 ครั้ง พบว่าวิธีผสมผสานสามารถลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงลงได้ 73.33 เปอร์เซ็นต์ และราคาผลผลิตเพิ่มขึ้น 28.26 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบปริมาณสารพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในผลผลิตดังกล่าว

เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตและผลตอบแทนต่อการลงทุน พบว่าในแปลงทดสอบแบบวิธีผสมผสานเสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิต 9,382.00 บาท ได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 4.86 ส่วนวิธีของเกษตรกรเสียค่าใช้จ่ายเป็นต้นทุนการผลิตสูงกว่าคือ 10,820.00 บาท/ไร่ และได้ผลตอบแทนต่อการลงทุน 3.02

จากผลการทดสอบในครั้งนี้สามารถแนะนำและถ่ายทอดให้เกษตรกรและผู้เกี่ยวข้องนำไปปฏิบัติได้ต่อไป ซึ่งเป็นวิธีการที่คุ้มทุน และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกรทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช คุณศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย คุณสมรวย รวมชัยอภิกุล คุณสุมณฑา ธีระชีพ คุณสิริรัตน์ อิ่มเชิง คุณจันทรา ช้างจีน เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ ที่ช่วยรวบรวมข้อมูล คุณนงลักษณ์ ขันตีและคุณสุนทร บุญพิทักษ์ ที่ช่วยพิมพ์ผลงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กมล เลิศรัตน์. อรสา ดิสถาพร สุขาดา เตชะวงค์เสถียร และวีระ ภาคอุทัย. 2544. รายงานการประมวลองค์ความรู้เรื่องผักในประเทศ สถานภาพของการผลิต การตลาด และการวิจัย. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรุงเทพฯ 190 น.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์ นงพร กิจบำรุง จักรพงศ์ พิริยพล ศรีสุดา โท้ทอง สมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ อุราพร ใจเพ็ชร ศรีจำนรรจ์ พิชิตสุวรรณชัย สมรวย รุ่งรัตนวารี สัจจะ ประสงค์ทรัพย์. 2542. เอกสารวิชาการ แมลงศัตรูผัก. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 97 น.

วินัย รัชตปกรณ์ชัย ณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม และภัควิภา เพชรวิชิต. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกะหล่ำดอกโดยวิธีผสมผสาน *ใน* เอกสารวิชาการ การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 95 – 99

ตารางที่ 1 ชนิดของศัตรูที่สำคัญบนกะหล่ำดอก และแมลงศัตรูธรรมชาติในวิธีผสมผสานและวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

ชื่อแมลงศัตรู	ชื่อวิทยาศาสตร์	ศัตรูธรรมชาติ
1. หนอนใยผัก	*Plutella xylostella* (Linnaeus)	***แตนเบียนหนอน*** **Cotesia plutellae**
(Diamondback moth)		
2. ด้วงหมัดผัก	*Phyllotreta chontanica* Duvivier	-
(Leaf eating beetle)	*Phyllotreta sinuata* Steph	
3. หนอนกระทู้หอม	*Spodoptera exigua* (Hubner)	แตนเบียนหนอน *Microplitis manilae*
(Beet army worm)		
4. หนอนกระทู้ผัก	*Spodoptera litura* (Fabricius)	แตนเบียนหนอน *Microplitis manilae*
(Common cutworm)		
5. หนอนคืบกะหล่ำ	*Trichaplusia ni* Hubner	-
(Cabbage looper)		
โรคพืช		
1. ราน้ำค้าง	*Peronospara parasitica*	
วัชพืช		
1. ผักเบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrum* Linn.	
2. แห้วหมู	*Cyperus rotundus* Linn.	

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนประชากรแมลงศัตรูกะหล่ำดอกที่พบในวิธีผสมผสานและวิธีเกษตรกร ที่ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี กุมภาพันธ์ – มีนาคม 2546

อายุพืชหลังปลูก (วัน)	วิธีผสมผสาน						อายุพืชหลังปลูก(วัน)	เกษตรกร					
	หนอนใยผัก		หนอนกระทู้ผัก	หนอนกระทู้หอม	หนอนคืบกะหล่ำ	ด้วงหมัดผัก		หนอนใยผัก		หนอนกระทู้ผัก	หนอนกระทู้หอม	หนอนคืบกะหล่ำ	ด้วงหมัดผัก
	ไข่	หนอน						ไข่	หนอน				
9	0.03	0.15	0.03	0.10	0	0	4	0.13	0.10	0	0.03	0	0
13	0.05	0.38*	0	0	0	0	8	0	0.20	0	0.04	0	0
16	0	1.65*	0.08	0. 04	0	0	11	0.02	2.45*	0	0.12*	0.05	0
20	0.02	0.70*	0.14*	0.04	0.02	0	15	0.15	0.08	0	0.17*	0.02	0
23	0	0.27*	0.02	0.05	0.01	0	18	0.62	0.34*	0.06	0	0.06	0
27	0.35	0.23	0.01	0.04	0.09	0.01	22	0.40	1.58*	0.06	0.20*	0.03	0.05
30	0	0.80*	2.85*	0	0.03	0	25	0.80	6.05*	0.83*	0.15*	0	0
34	0.30	1.03*	0.68*	0.18*	0.07	0	29	1.55	1.73*	0.06	0.01	0.03	0
37	0.45	0.90*	0.22*	0.08	0.04	0	32	0.98	0.90*	0.10*	0.08	0	0
41	0.68	0.53*	0.74*	0.09	0.04	0.01	36	0.68	4.78*	0.02	0.03	0.01	0
44	0.55	1.78*	0.43*	0	0.03	0	40	1.28	3.33*	0	0.15	0	0
48	3.30	1.65*	0.05	0.03	0.05	0	44	3.30	1.93*	0	0	0	0

* หนอนใยผัก / หนอนกระทู้หอม / หนอนกระทู้ผัก สูงเกินระดับเศรษฐกิจ

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียนหนอนบนต้นกะหล่ำดอก ในวิธีผสมผสาน และวิธีเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

อายุพืชหลังปลูก (วัน)	เปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียน วิธีผสมผสาน		อายุพืชหลังปลูก (วัน)	เปอร์เซ็นต์การทำลายของแตนเบียน วิธีเกษตรกร	
	LP 1	LP 2		LP 1	LP 2
9	0	0	4	20.00	0
13	0	0	8	0	0
16	7.05	0	11	0	0
20	24.33	9.09	15	0	0
23	42.56	12.50	18	0	0
27	10.00	0	22	1.57	0
30	11.12	0	25	0	2.50
34	2.38	0	29	0	0
37	5.27	0	32	5.27	0
41	8.70	1.18	36	0.52	0
44	7.80	0	40	0.75	0
48	12.00	0	44	1.29	0
รวม	**131.21**	**22.77**	**รวม**	**29.40**	**2.50**
เฉลี่ย	**10.93**	**1.90**	**เฉลี่ย**	**2.45**	**0.21**

LP1 = แตนเบียนหนอนของหนอนใยผักชนิด *Cotesia plutellae*

LP2 = แตนเบียนของหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอม *Microplitis manilae*

ตารางที่ 4 จำนวนประชากรหนอนใยผัก ด้วงหมัดผัก และแตนเบียนหนอนใยผักบนกับดักกาวเหนียวสีเหลือง ในวิธีผสมผสาน ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี 2546

อายุพืช	วิธีผสมผสาน				
	ตัวเต็มวัยของแมลงศัตรูกะหล่ำดอก			ศัตรูธรรมชาติ	
	หนอนใยผัก	หนอนกระทู้หอม	หนอนกระทู้ผัก	แตนเบียนหนอน[1/]	แมลงวันก้นขน
27 ก.พ.	0.20	0	0	0.05	0.45
6 มี.ค.	0.35	0	0	0	1.00
13 มี.ค.	0.50	0.05	0	0	1.20
20 มี.ค.	3.45	0	0.05	0.15	0.55
27 มี.ค.	4.00	0	0.05	0	0.30
รวม	**8.50**	**0.05**	**0.10**	**0.20**	**3.50**
เฉลี่ย	**1.70**	**0.01**	**0.02**	**0.04**	**0.70**

[1/] แตนเบียนหนอน *Cotesia plutellae*

ตารางที่ 5 ชนิดและอัตราของสารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

ชนิดของสารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช / อัตราการใช้	
วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
สารฆ่าแมลง (มล./น้ำ 100 ลิตร/ไร่)	สารฆ่าแมลง (มล./น้ำ 100 ลิตร/ไร่)
- chlorfenapyr 10%EC/100	- chlorfenapyr 10% EC/100
	- fipronil 5% SC/200
	- abamectin 18% EC/200
	- cypermethrin 35% EC/200
	- spinosad12% SC/100
เชื้อจุลินทรีย์ (มล./น้ำ 100 ลิตร)	เชื้อจุลินทรีย์
- Bt. (Florbac FC.)/250	-
สารกำจัดโรคพืช (มล./น้ำ 100 ลิตร)	สารกำจัดโรคพืช
- metalaxyl* 35%SD	-
- iprodione* 50% WP	
- iprodione 50% WP/300	
(10 กรัม/เมล็ด 1 ก.ก.)	
กาวเหนียว (มล./80 กับดัก/ไร่)	
- คินริว / 400	
ปุ๋ยเคมีและอาหารเสริม (กก./ไร่/ครั้ง)	ปุ๋ยเคมีและอาหารเสริม (กก./ไร่/ครั้ง)
- 25-7-7/100	- 25-7-7/50
- 16-16-16/100	- 16-16-16/100
- Ca + Bo/100	

ตารางที่ 6 ชนิดและอัตราของสารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืชระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

ชนิดของสารเคมีและสารกำจัดศัตรูพืช / อัตราการใช้	
วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
สารฆ่าแมลง	สารฆ่าแมลง
- chlorfenapyr / 4	- fipronil / 1
	- fipronil + chlorfenapyr / 1
	- abamectin + cypermethrin / 1
	- chlorfenapyr + spinosad / 3
รวม 4 ครั้ง	**รวม 6 ครั้ง**
เชื้อจุลินทรีย์	เชื้อจุลินทรีย์
- Bt. (Florbac FC) / 5	-
สารกำจัดโรคพืช	สารกำจัดโรคพืช
- metalaxyl + iprodione* / 1	-
- iprodione / 1	
รวมคลุกเมล็ดก่อนปลูก 2 ชนิด 1 ครั้ง	
รวม 3 ชนิด 11 **ครั้ง**	**รวม** 5 **ชนิด 6 ครั้ง**

* คลุกเมล็ดก่อนปลูก

ตารางที่ 7 อัตราการพ่นสารต่อไร่ จำนวนครั้ง ในการพ่นสารและเปอร์เซ็นต์ลดการใช้สารระหว่างวิธีผสมผสานกับวิธีการของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
1. ปริมาณสารฆ่าแมลง (ลิตร , กก. / ไร่)	0.40	1.50
ลดปริมาณการใช้สารลงได้	73.33	-
2. น้ำหนักผลผลิตที่ได้คุณภาพ (กก./ไร่)	4,361	2,994
ได้น้ำหนักผลผลิตเพิ่มขึ้น (%)	31.35	-
3. มูลค่าผลผลิต / ไร่	45,606	32,720
ได้มูลค่าผลผลิตเพิ่มขึ้น (%)	28.26	-
4. ระดับความเป็นพิษ (WHO)		
ชนิดมีพิษร้ายแรงมาก (Ia)	-	1
ชนิดมีพิษร้ายแรง (Ib)	-	1
ชนิดมีพิษปานกลาง (II)	1	-
ชนิดที่พิษน้อย (III)	1	-
5. พิษตกค้าง	ND	ND

ตารางที่ 8 น้ำหนักผลผลิต จำนวนผลผลิต และราคาผลผลิต ในการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสานกับวิธีของเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2545

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
น้ำหนักผลผลิต (กก./ไร่)		
น้ำหนักผลผลิตทั้งหมด	**4,860**	**3,689**
น้ำหนักผลผลิตได้คุณภาพ[1/]	4,361	2,994
น้ำหนักผลผลิตได้คุณภาพ (กก./หัว)	0.62	0.54
น้ำหนักผลผลิตไม่ได้คุณภาพ[2/]	499	695
จำนวน (หัว/ไร่)		
จำนวนหัวทั้งหมด	**8,311**	**6,929**
จำนวนหัวได้คุณภาพ	6,982	5,596
จำนวนหัวไม่ได้คุณภาพ	1,329	1,333
ราคาผลผลิตได้คุณภาพ[1/]	43,610	29,940
ราคาผลผลิตไม่ได้คุณภาพ [2/]	1,996	2,780
รวมราคาผลผลิตทั้งหมด	**45,606**	**32,720**

[1/]ราคาผลผลิต คำนวณจากน้ำหนักผลผลิตราคา 10 บาท

[2/]ราคาผลผลิต คำนวณจากน้ำหนักผลผลิตราคา 4 บาท

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบต้นทุนการผลิต รายได้สุทธิ ผลตอบแทนต่อการลงทุนระหว่างวิธีผสมผสาน กับวิธีเกษตรกร ตำบลท่ายาง อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรี ปี 2546

	วิธีผสมผสาน	วิธีเกษตรกร
ต้นทุนการผลิต (C) บาท / ไร่		
1. แปลงเพาะกล้า		
- ค่าเมล็ดพันธุ์ (speed)	480	480
2. แปลงทดสอบ		
- ค่าเตรียมดิน	3,000	3,000
- ค่าปุ๋ย	1,780	2,210
- ค่าแรงใส่ปุ๋ย (100 บาท / ครั้ง)	200	300
- ธาตุอาหารรอง	68	-
- ค่ากาวเหนียว	336	-
- ค่ากับดัก	40	-
- ค่าสารกำจัดโรคพืช	258	-
- ค่าสารกำจัดแมลงศัตรูพืช	2,095	4,194
- ค่าสารจับใบ	125	36
- ค่าจ้างพ่นสารฆ่าแมลง (100 บาท / ครั้ง)	1,000	600
รวม ต้นทุนการผลิต (C)	**9,382**	**10,820**
ราคาผลผลิต (R) บาท / ไร่	45,606	32,720
กำไรสุทธิ (บาท / ไร่)	36,224	21,900
ผลตอบแทนต่อการลงทุน (R/C)	4.86	3.02

ภาคผนวก

ชนิดสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และสารกำจัดวัชพืช	**ระดับความเป็นพิษ (WHO)**	**ราคา (บาท / กก.,ลิตร)**
สารฆ่าแมลง		
chlorphenapyr (Rampage 10% EC)	II	3,800
spinosad (Success 12% SC)	III	6,000
fipronil (Ascend 5% SC)	Ib	1,360
abamectin (Abamectin 1.8% EC)	Ia	1,300
cypermethrin (ลักเซ่นทรอย 35% EC)	II	350
เชื้อจุลินทรีย์		
Bt. (Florbac FC)	-	460
สารกำจัดโรคพืช		
metalaxyl (Metalaxyl 35% SD)	-	360
iprodione (Rovral 50% WP)	-	860
สารเคมีอื่นๆ		
สารจับใบ (A – film)	-	240
สารจับใบ (Foil)	-	250
ปุ๋ยเคมี		(บาท/50 ก.ก.,ลิตร
ปุ๋ยน้ำที่มีธาตุอาหาร Ca+Bo (B-plus)	-	170
ปุ๋ยเคมีสูตร 25-7-7	-	460
ปุ๋ยเคมีสูตร 16-16-16	-	530
กาวเหนียวคินริว	-	280

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะม่วงโดยวิธีผสมผสาน

Integrated Insect Pest Control I Mango

สราญจิต ไกรฤกษ์ วิทย์ นามเรืองศรี อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ดำเนินการเปรียบเทียบการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะม่วง (IPC) และกรรมวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติที่ตำบลปากน้ำ อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี โดยมีพื้นที่แปลง IPC 10 ไร่ แปลงเกษตรกร 10 ไร่ เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีการปฏิบัติดูแล โดยในแปลง IPC จะตัดแต่งกิ่งมะม่วงให้โปร่งแสงแดดส่องได้มากกว่า 50 % ในการสำรวจและตรวจนับแมลงศัตรูที่สำคัญ คือ เพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น เมื่อมีปริมาณมากกว่าระดับเศรษฐกิจที่กำหนดคือ เพลี้ยไฟสูงมากกว่า 50% ในระยะใบอ่อนและสูงกว่า 30% ในระยะดอก สำหรับเพลี้ยจักจั่น สุ่มนับที่ช่อดอก 10 ช่อต่อต้น จำนวน 10 ต้น เมื่อพบเพลี้ยจักจั่นมากกว่า 5 ตัว/ช่อ ลงทำลายมากกว่า 50 % ของช่อดอกที่ตรวจนับ พ่นด้วยสารเคมี ส่วนแปลงเกษตรกรจะใช้วิธีการของเกษตรกรเอง ผลการทดลอง เปรียบเทียบแปลงการใช้สารฆ่าแมลงในระยะแตกใบอ่อนจนกระทั่งแทงช่อดอกและติดผล ในแปลง IPC ใช้สารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ formetanate (Dicazol 50 25%), lambda cyhalothrin (Karate 2.5%) และ imidacloprid (Confidor 10% SL) จำนวน 8 ครั้ง แปลงเกษตรกรใช้สารฆ่าแมลง 7 ชนิด ได้แก่ formetanate (Dicazol 50 25%), lambda cyhalothrin (Karate 2.5%), cabaryl (Sevin 85%), cypermethrin (RIPCord 10% EC), carbosulfan (Posse 20%), malathion (Malathion 83% EC) และ imidacloprid (Confidor 10% SL) จำนวน 11 ครั้ง สารเคมีที่ใช้เมื่อเกิดการระบาดของศัตรูมะม่วงในแปลง IPC พ่นสารฆ่าแมลง , สารป้องกันกำจัดโรคพืช , การให้ปุ๋ย, ธาตุอาหาร รวมทั้งหมด 26 ครั้ง แปลงเกษตรกร 32 ครั้ง ในการทดลองนี้แปลง IPC พ่นสารฆ่าแมลงน้อยกว่าแปลงเกษตรกร 27.27% ผลผลิตของทั้ง 2 แปลงไม่แตกต่างกัน

รหัส 38 06011 014

คำนำ

มะม่วงจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีแหล่งปลูกที่สำคัญในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากมะม่วงเป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมสูง สามารถผลิตได้ตลอดทั้งปี มีหลากหลายสายพันธุ์ ทำให้มีการกระจายสู่ตลาดภายในประเทศ และมีการขยายตลาดไปยังต่างประเทศ ทำรายได้เข้าประเทศและต่อเกษตรกรผู้ปลูกเป็นจำนวนมาก ดังนั้น เกษตรกรจึงมีการดูแลรักษามะม่วงอย่างดีทั้งด้านการผลิตและอารักขาพืชเพื่อป้องกันผลผลิต ในปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีหลายอย่างเพื่อบังคับให้มะม่วงออกผลในช่วงฤดูที่ต้องการ และได้ผลผลิตที่ตรงต่อความต้องการของตลาด อย่างไรก็ตามเกษตรกรต้องประสบกับปัญหาการผลิตด้านต่างๆ เช่นสภาพดินฟ้า อากาศที่ผันแปร และปัญหาศัตรูพืชทั้งโรคและแมลงที่ระบาดทำความเสียหายต่อมะม่วงอย่างมาก มะม่วงมีแมลงศัตรูหลายชนิดเข้าทำลายทำความเสียหายส่งผลให้ผลผลิตลดลง คุณภาพผลผลิตต่ำลงทำให้ชาวสวนมะม่วงต้องใช้สารฆ่าแมลงเพิ่มขึ้นอย่างมาก และใช้กันมากโดยเฉพาะในแปลงมะม่วงที่ผลิตเพื่อการส่งออก ซึ่งต้องการผลผลิตที่มีคุณภาพดีและปริมาณเพียงพอเพื่อการตลาด การระบาดของแมลงศัตรูมะม่วงมีตลอดทั้งปีอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในระยะแตกใบอ่อน และออกดอก ซึ่งมีสาเหตุจาก การผลิตมะม่วงนอกฤดู แต่ละระยะการเจริญเติบโตของมะม่วง จำเป็นต้องใช้สารเคมีอย่างมากมาย ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม จึงจำเป็นต้องทดสอบวิธีการการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะม่วงโดยวิธีผสมผสานอย่างต่อเนื่อง โดยเน้นการใช้สารเคมีให้น้อยลง แต่ยังคงให้ผลผลิตตรงความต้องการของตลาด และถูกต้องตามหลักวิชาการเหมาะสมทั้งทางด้านเศรษฐกิจสังคมและสภาพแวดล้อม ซึ่งได้นำกรรมวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีต่างๆ มาประยุกต์ แล้วทดลองปฏิบัติเพื่อให้ได้ผลตอบแทนคุ้มค่า อีกทั้งยังจะต้องศึกษาการใช้สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพตลอดจนเทคนิคการใช้เครื่องพ่นสารอย่างเหมาะสม เพื่อลดปัญหาสารพิษตกค้างในผลผลิต และลดมลพิษในสภาพแวดล้อมด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สวนมะม่วง อายุ 5 - 10 ปี แปลงละ 10 ไร่ 2 แปลง
2. สารฆ่าแมลง
3. สารป้องกันกำจัดโรคพืชตามความจำเป็น
4. ปุ๋ยและอาหารเสริมตามความจำเป็น
5. กับดักกาวเหนียว
6. เครื่องยนต์พ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง
7. เครื่องมือวัดอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ความเร็วลม

8. นาฬิกาจับเวลา

9. ถังแช่เย็น

10. น้ำแข็งแห้ง

11. แผ่นพลาสติกสีเหลือง ขนาด 10 x 12 นิ้ว จำนวน 10 แผ่น

12. ถุงพลาสติกใส ขนาด 10 x 12 นิ้ว และ 20x 24 นิ้ว

13. สวิงโฉบแมลง

14. กล้องจุลทรรศน์ แบบ Stereo microscope และ Compound microscope

15. คีมคีบ เข็มเขี่ย

16. ที่นับแมลง

17. เครื่องเขียน และอุปกรณ์จำเป็นอื่น ๆ

วิธีการ

ทำการวิจัย โดยมีทะเบียนวิจัย และขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

1.1 แผนการทดลอง -

1.2 กรรมวิธี มี 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธี 1 เป็นวิธีการป้องกันกำจัดโดยวิธีผสมผสาน โดยการตรวจนับใช้ระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจช่วยในการตัดสินใจพ่นสารเคมี

กรรมวิธี 2 เป็นวิธีการป้องกันกำจัดโดยวิธีของเกษตรกร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

<u>กรรมวิธีที่ 1</u> เป็นแปลงทดลองที่กำหนดวิธีปฏิบัติในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูมะม่วง โดยจะตรวจนับแมลงที่ สำคัญ คือ เพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น เมื่อพบแมลงมากกว่าระดับที่กำหนด จึงพ่นสารเคมี ต่อไปนี้

เพลี้ยไฟ สุ่มเคาะโดยใช้แผ่นพลาสติกรองรับ จากยอดอ่อน จำนวน 10 ยอด ต่อต้น สุ่มให้กระจายรอบต้น จำนวน 10 ต้น ทุกสัปดาห์ เมื่อพบเพลี้ยไฟทำลายมากกว่า 50 % ของจำนวนยอดที่ตรวจนับ จะพ่นด้วยสารเคมี imidacloprid อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร หรือ formetanate อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร หรือ เมื่อมะม่วงแทงช่อดอก สุ่มนับเพลี้ยไฟ จำนวน 10 ช่อต่อต้น สุ่มโดยกระจายรอบต้น จำนวน 10 ต้น เมื่อพบการทำลายมากกว่า 30 % ของช่อดอกที่ตรวจนับ ให้พ่นด้วยสารเคมีดังกล่าวเช่นกัน ตรวจนับทุกสัปดาห์ (ในระยะดอกบาน งดพ่นสารเคมี) จนกระทั่งติดผลสุ่มตรวจนับที่ผลอ่อน ตามวิธีเช่นเดียวกัน

เพลี้ยจักจั่น สุ่มนับที่ช่อดอก 10 ช่อต่อต้น จำนวน 10 ต้น เมื่อพบเพลี้ยจักจั่นมากกว่า 5 ตัว/ช่อ ลงทำลาย มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของช่อดอกที่ตรวจนับ พ่นด้วยสารเคมี lambda cyhalothrin อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร หรือ permethrin อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 เป็นแปลงที่เป็นวิธีการปฏิบัติของเกษตรกรเอง

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนยอดอ่อน ช่อดอก ที่พบเพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น และแมลงศัตรูอื่น ๆ
- บันทึกแมลงมีประโยชน์ เช่น แมลงช่วยผสมเกสร และศัตรูธรรมชาติ
- บันทึกการปฏิบัติดูแล เช่น การใส่ปุ๋ย วิธีการตัดแต่งกิ่ง การใช้สารกำจัดโรคพืช การเก็บผลผลิต

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2543 - กันยายน 2546

สถานที่ สวนมะม่วงเกษตรกรตำบลปากน้ำ อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ห้องปฏิบัติการเลี้ยงแมลง กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูไม้ผล ฯ กองกีฏและสัตววิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการตรวจนับแมลงศัตรูมะม่วงในแปลงทดลองตลอดปี (ตารางที่ 1) พบปริมาณแมลงในแปลง IPC และแปลงเกษตรกร ไม่แตกต่างกันนัก ปริมาณแมลงศัตรูที่สำคัญที่ตรวจนับได้แก่เพลี้ยไฟ ในแปลง IPC พบเฉลี่ย 16.10 ตัว/ยอด และแปลงเกษตรกร พบเฉลี่ย 24.11 ตัว/ยอด เพลี้ยจักจั่น ในแปลง IPC พบเฉลี่ย7.23 ตัว/ยอด และแปลงเกษตรกร พบเฉลี่ย 5.33 ตัว/ยอด ไม่พบหนอนแมลงวันผลไม้ในแปลงทดลองทั้งสอง แต่จากการตรวจนับแมลงวันผลไม้ในกับดักพบ ในแปลง IPC พบเฉลี่ย 42.10 ตัว/กับดัก และแปลงเกษตรกร พบเฉลี่ย 34.48 ตัว/กับดัก

ผลเปรียบเทียบการใช้สารเคมีระหว่างแปลง IPC และแปลงเกษตรกร (ตารางที่ 2 และตารางที่ 3) พบว่าแปลง IPC ใช้สารฆ่าแมลง 3 ชนิด ได้แก่ formetanate (Dicarzol 50 25% SP) อัตรา 30 กรัมและ carbaryl (Sevin 85 %WP) อัตรา 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ lambda-cyhalothrin (Karate 2.5% EC) และ imidacloprid (Confidor 10% SL) อัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่น รวมใช้สารฆ่าแมลง 8 ครั้ง สารป้องกันกำจัดโรคพืช 1 ชนิด คือ carbendazim จำนวน 14 ครั้ง เมื่อจำแนกโดยประเภทและจำนวนครั้งที่พ่นสาร แล้วจะเห็นว่า ในแปลง IPC พ่นสารฆ่าแมลงแต่เพียงอย่างเดียว 4 ครั้ง สารป้องกันกำจัดโรคพืช 2 ครั้ง สารฆ่าแมลงผสมสารป้องกันกำจัดโรคพืช 11 ครั้ง รวมสารเคมีที่ใช้เมื่อเกิดการระบาดของศัตรูมะม่วง พ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช รวม 26 ครั้ง

ส่วนแปลงเกษตรกรใช้สารฆ่าแมลง 7 ชนิดได้แก่ formetanate, lambda-cyhalothrin, carbaryl, cypermethrin, carbosulfan, malathion และ imidacloprid รวมใช้ 11 ครั้ง สารป้องกันกำจัด

โรคพืช 1 ชนิด คือ carbendazim 14 ครั้ง ในแปลงเกษตรกร พ่นสารฆ่าแมลงเพียงอย่างเดียว 3 ครั้ง พ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืช 2 ครั้ง เท่ากับในแปลง IPC และการพ่นสารฆ่าแมลงและสารป้องกันกำจัดโรคพืชและปุ๋ย รวมจำนวนการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ทั้งหมด 32 ครั้ง มากกว่าในแปลง IPC 6 ครั้ง คิดเป็นผลต่างของการใช้สารในแปลงเกษตรกรมากกว่าแปลง IPC 18.75 %

ปี 2546 การลงทุนและผลตอบแทนของวิธี IPC และเกษตรกร (ตารางที่ 4) ต้นทุนการผลิต ซึ่งประกอบไปด้วย ค่าสารฆ่าแมลง สารป้องกันกำจัดโรคพืช วัชพืช ปุ๋ย และค่าจ้างแรงงาน ต้นทุนรวมในแปลง IPC 10,960 บาท/ไร่ ปริมาณผลผลิตที่ได้ 560 กิโลกรัม/ไร่ ราคาผลผลิตเฉลี่ย ตลอดการเก็บผลได้ราคา 24 บาท/กิโลกรัม (ในแปลง IPC ทยอยเลือกเก็บผลเป็นรุ่นๆ และคัดแยกคุณภาพขายตามราคาตลาดท้องถิ่น) รายได้แปลง IPC 13,440 บาท/ไร่ คิดเป็นได้กำไร 2,480 บาท/ไร่

ต้นทุนการผลิตในแปลงเกษตรกร รวมค่าใช้จ่าย 11,445 บาท/ไร่ มากกว่าแปลง IPC ที่มีการใช้สารฆ่าแมลงเพิ่มมากกว่า ปริมาณผลผลิตได้ 620 กิโลกรัม/ไร่ และได้ราคาผลผลิตเฉลี่ย 22 บาท/กิโลกรัม ซึ่งเป็นการขายแบบเหมาแปลงให้แก่ผู้รับซื้อ ได้รายได้ 13,640 บาท/ไร่ แปลง IPC กำไรมากกว่า 11.49% สัดส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุนแปลง IPC 1.23 และแปลงเกษตรกร 1.19

ตารางที่ 1 ปริมาณแมลงศัตรูมะม่วงและศัตรูธรรมชาติ (ตัว/ยอด) [1/] ในแปลงมะม่วง IPC และแปลงเกษตรกร อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ปี 2546

ชนิดแมลงศัตรูพืช	ปี 2546	
	แปลง IPC	แปลงเกษตรกร
เพลี้ยไฟ	16.10 [1/]	24.11
เพลี้ยจักจั่นฝอย	0.13	0.08
เพลี้ยจักจั่น	7.23	5.33
หนอนเจาะยอด	0.05	5.33
หนอนคืบกินใบ	2.46	0.14
หนอนเจาะผล	0.07	0.02
หนอนแมลงวันผลไม้	0.00	0.00
แมลงวันผลไม้(จากกับดัก)	42.10	34.48
ศัตรูธรรมชาติ		
แมงมุม	0.14	0.00
ไข่แมลงช้างปีกใส	0.05	0.00
ด้วงเต่าตัวห้ำ	0.64	0.04

[1/]ปริมาณแมลงเฉลี่ย (ตัว/ยอด) จากการตรวจนับตลอดปี

ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ในแปลง IPC และแปลงเกษตรกร อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ปี 2546

วิธีการ	ปี 2546	
	สารฆ่าแมลง/ครั้ง	สารป้องกันกำจัดโรคพืช/ครั้ง
IPC	formetanate / 3 lambda cyhalothrin / 2 imidacloprid / 3	carbendazim / 14
รวม (ชนิด/ครั้ง)	**3 / 8**	**1 / 14**
เกษตรกร	formetanate / 1 lambda cyhalothrin / 1 carbaryl / 1 cypermethrin / 3 carbosulfan / 2 malathion / 1 imidacloprid / 2	carbendazim / 14
รวม (ชนิด/ครั้ง)	**7 / 11**	**1 / 14**
ลดจำนวนครั้งการใช้สาร (%)	**27.27**	**0**

ตารางที่ 2 การใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช และสารอื่น ๆ ในแปลงมะม่วง IPC และแปลงเกษตรกร อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรี ปี 2546

สารเคมี	ปี 2546	
	IPC	**เกษตรกร**
สารฆ่าแมลง	4	3
สารป้องกันกำจัดโรคพืช	2	2
สารฆ่าแมลง + สารป้องกันกำจัดโรคพืช	11	14
สารฆ่าแมลง + สารป้องกันกำจัดโรคพืช + ปุ๋ย	3	2
สารฆ่าแมลง + ปุ๋ย	3	4
สารป้องกันกำจัดโรคพืช + ปุ๋ย	1	5
ปุ๋ย + ธาตุอาหารอื่น ๆ		
paclobutrazol	1	1
KNO_3	1	1
รวม (ครั้ง)	**26**	**32**
ผลต่าง (%)		**18.75**

ตารางที่ 4 ต้นทุนการผลิต ราคาผลผลิต ในแปลงมะม่วง IPC และแปลงเกษตรกร อำเภอเดิมบางนางบวช จังหวัดสุพรรณบุรีในปี 2546

รายการ	ปี 2546	
	IPC	เกษตรกร
1. ค่าสารฆ่าแมลง (บาท/ไร่)	3,210	3,945
2. ค่าสารป้องกันกำจัดโรคพืช (บาท/ไร่)	1,850	1,850
3. ค่าปุ๋ย (บาท/ไร่)	1,600	1,600
4. ค่าสารกำจัดวัชพืช (บาท/ไร่)	800	800
5. ค่าตอบแทน – ค่าจ้าง (บาท/ไร่)	3,500	3,250
ต้นทุนรวม (บาท/ไร่) (C)	**10,960**	**11,445**
ผลผลิต (กิโลกรัม/ไร่)	**560**	**620**
รายได้ (บาท/ไร่) (R) [1/]	**13,440**	**13,640**
กำไร (บาท/ไร่)	**2,480**	**2,195**
กำไร (%) [2/]	**11.49**	
สัดส่วนผลตอบแทนต่อการลงทุน (R/C)	**1.23**	**1.19**

[1/] ปี 2546 ราคาผลผลิตเฉลี่ยตลอดช่วงการเก็บผลผลิต ในแปลง IPC และ แปลงเกษตรกร 24 และ 22 บาท / กิโลกรัม ตามลำดับ

[2/] กำไรเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับแปลงเกษตรกร

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การทดสอบวิธี IPC ในแปลงมะม่วงโดยคำนึงถึงสถานการณ์การระบาดของแมลงศัตรูมะม่วงที่สำคัญ ได้แก่ เพลี้ยไฟ เพลี้ยจักจั่น หนอนชนิดต่างๆ เมื่อสำรวจตรวจนับพบว่ามีปริมาณแมลงศัตรูสูงเกินระดับความเสียหายทางเศรษฐกิจ ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตที่สำคัญ จึงพ่นสารฆ่าแมลง โดยคำนึงถึงการใช้สารเคมีให้น้อยที่สุด ในปี 2546 สามารถลดจำนวนครั้งในการใช้สารเคมีได้ 27.27% สัดส่วนผลการตอบแทนต่อการลงทุน 1.23 ส่วนวิธีการของเกษตรกร มีสัดส่วนผลการตอบแทนต่อการลงทุน 1.19

เอกสารอ้างอิง

กองกีฏและสัตววิทยา. 2545. คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมลงและสัตว์ศัตรูพืชปี 2545. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.

นิรนาม. 2543. คู่มือการปฏิบัติดูแลรักษาสวนมะม่วง (ตามแนวทางการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน). โครงการป้องกันและกำจัดศัตรูไม้ผลโดยวิธีผสมผสานไทย -เยอรมัน. กรมวิชาการเกษตร-กรมส่งเสริมการเกษตร. 61 หน้า.

สราญจิต ไกรฤกษ์. 2540. แมลงศัตรูสำคัญของมะม่วง. หน้า 1-19. ใน เอกสารวิชาการเรื่อง แมลงศัตรูไม้ผล การอบรมหลักสูตรแมลง -สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัดครั้งที่ 9,24 มีนาคม-4 เมษายน 2540.

สุชาติ วิจิตรานนท์. 2537. การควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี . หน้า 149-162. ใน การสัมมนาทางวิชาการอารักขาพืชเพื่อความปลอดภัยและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร. 13-15 กรกฎาคม 2537. โรงแรมเพชรงาม จ. เชียงใหม่.

สุชาติ วิจิตรานนท์ และ มาโนช ทศพล . 2537. ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีบางชนิดในการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง. รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2537. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 104-109.