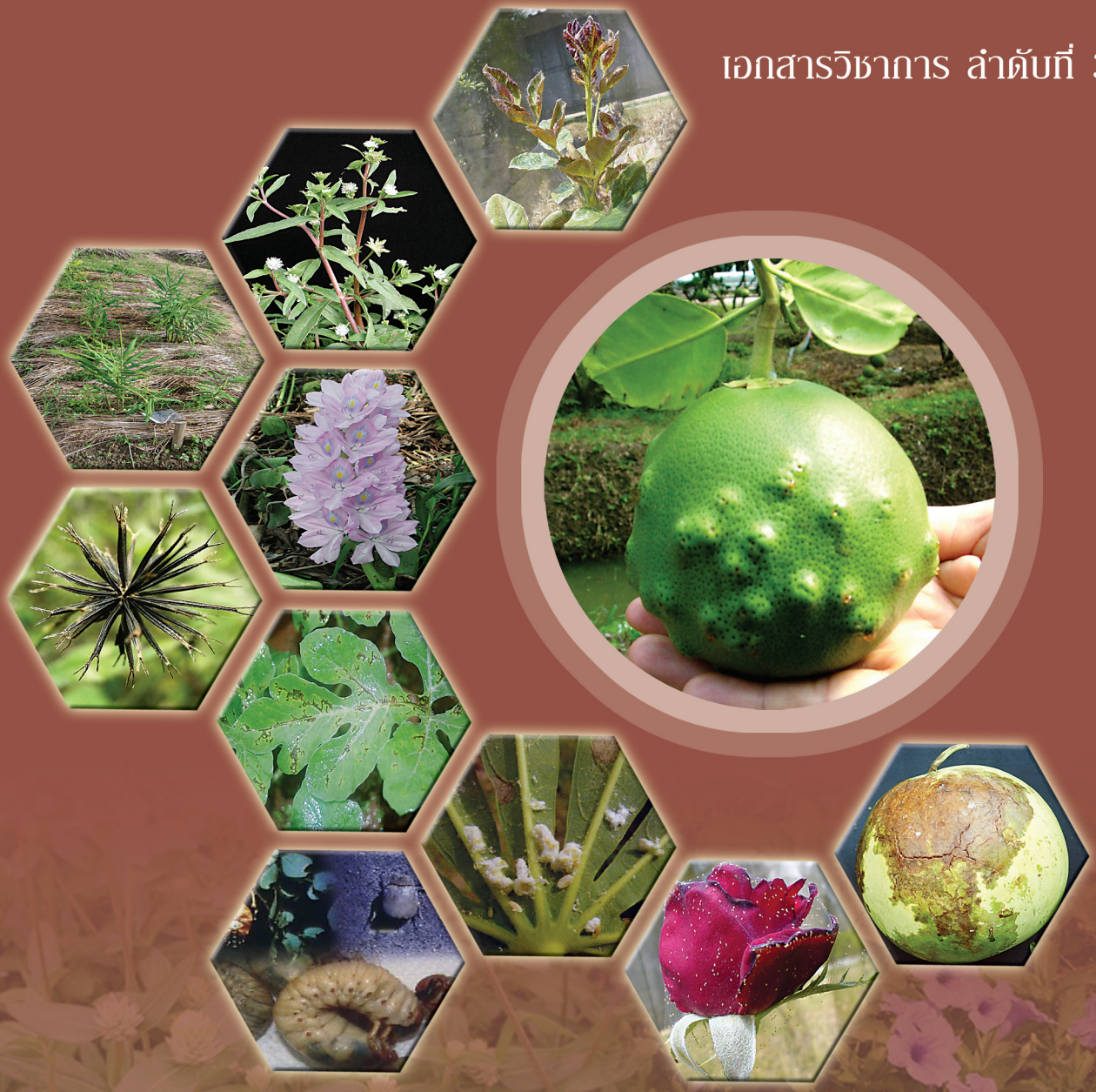
เล่ม ๒

รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๒

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Plant Protection Research and Development Office
Annual Report 2009

เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 3/2553

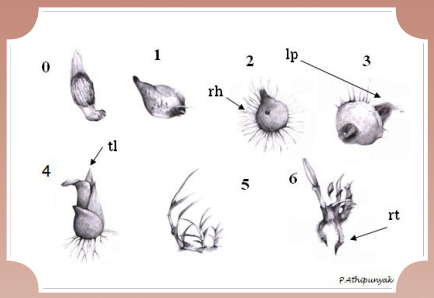


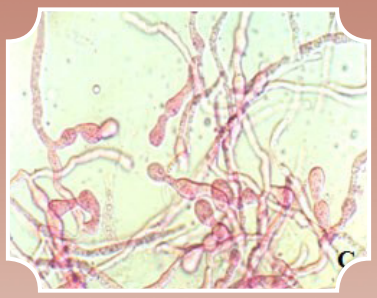
กรมวิชาการเกษตร
Department of Agriculture
แหล่งความรู้ แหล่งพัฒนา แหล่งก้าวหน้า

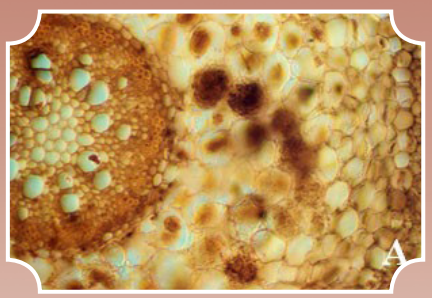
กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

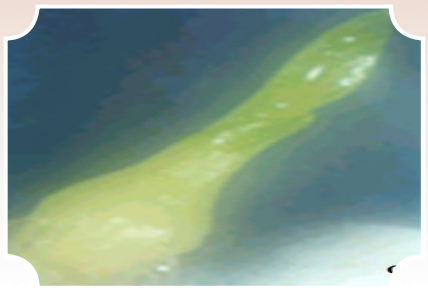
peloton

ไคลอริโรซาบนอาหาร OMA
กระดาษกรอง
เมล็ดกล้วยไม้บนกระดาษกรอง


0
1
2
lp
3
rh
tl
4
5
6
rt







รายงาน
ผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๒
เล่มที่ ๒

ลำดับเลขที่ 3/2553

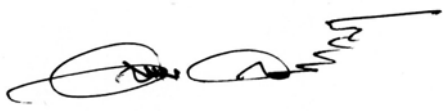
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

คำนำ

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้จัดทำรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2552 ขึ้น โดยรวบรวมผลงานค้นคว้าวิจัยของข้าราชการจาก กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช กลุ่มวิจัยวัชพืช และกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ซึ่งมีเนื้อหาเกี่ยวข้องกับ แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช โรคพืช วัชพืช และวิชาการกักกันพืช ทั้งนี้ในรายงานประจำปี 2552 มีผลงานการทดลองอยู่ในแผนงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ทั้งสิ้น 12 แผน ในโครงการวิจัย 30 โครงการ แบ่งเป็น 54 กิจกรรม 80 กิจกรรมย่อย รวมเป็นการทดลองทั้งสิ้น 239 เรื่อง เอกสารวิชาการเล่มนี้ประกอบด้วย การทดลองที่เสร็จสมบูรณ์ ในปี พ.ศ. 2552 และรายงานความก้าวหน้าการทดลองที่ต้องดำเนินการต่อไป

การจัดทำรายงานผลงานวิจัย ประจำปี 2552 เสร็จสมบูรณ์ ด้วยความร่วมมือจากหัวหน้าการทดลองทุกกลุ่มงานเป็นอย่างดี ดังนั้นสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช หวังเป็นอย่างยิ่งว่าเอกสารวิชาการเล่มนี้สามารถใช้เผยแพร่ความรู้ทางวิชาการอันจะเกิดประโยชน์ กับนักวิชาการและผู้สนใจงานด้านอารักขาพืชสืบไป



(นายสุธน สุวรรณบุตร)

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สารบัญ

หน้า

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัย ศึกษาสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดใหม่ 07-01-49-01

กิจกรรม ศึกษาสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดใหม่

กิจกรรมย่อย ศึกษาสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดใหม่

การทดลอง - ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่น.....1
ในมะม่วง
โดย นางสาวสราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

- ประสิทธิภาพสารสกัดสะเดา น้ำมันปิโตรเลียมและสารฆ่าแมลง.....10
ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้งในหน่อไม้ฝรั่ง
โดย นางอุราพร หนูนารถ และคณะ

- ประสิทธิภาพแบคทีเรีย ไวรัส และสารฆ่าแมลงในการ.....13
ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม
โดย นางอุราพร หนูนารถ และคณะ

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด.....16
หนอนเจาะฝักถั่วเหลือง
โดย นายสุเทพ สหายา และคณะ

- การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัด.....27
แมลงศัตรูสำคัญของกระเพราและโหระพา
โดย นายสุเทพ สหายา และคณะ

- การศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดวัชพืชชนิดใหม่.....47
ในพืชเศรษฐกิจ (ถั่วเหลืองฝักสด)
โดย นายคมสัน นครศรี และคณะ

- ประสิทธิภาพแบคทีเรีย ไวรัส และสารฆ่าแมลงในการ.....55
ป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ผักและผลกระทบต่อแมลงศัตรูธรรมชาติในพริก
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น

- ประสิทธิภาพของสารควบคุมไส้เดือนฝอยเพื่อป้องกันกำจัด.....61
โรครากปมในพริก
โดย นายมนตรี เอี่ยมวิมังสา และคณะ

- ทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด.....70
หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) (Hubner)
ในกระเจี๊ยบเขียว
โดย นายสมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ
- ประสิทธิภาพน้ำมันปิโตรเลียม และสารฆ่าแมลงบางชนิด.....76
ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยหอยและเพลี้ยแป้งในขิง
โดย นายสมศักดิ์ ศิริพลตั้งมั่น
- การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงและสารสกัดจาก.....79
ธรรมชาติป้องกันกำจัดแมลงศัตรูสำคัญในผักชี และผักชีฝรั่ง
โดย นายสุเทพ สหายา และคณะ
- การทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงและสารสกัดธรรมชาติ.....84
ป้องกันกำจัดเพลี้ยแป้ง *Dysmicoccus* sp. ในน้อยหน่า
โดย นางสาวพวงผกา อ่างมณี และคณะ
- ทดสอบประสิทธิภาพและพัฒนาเทคนิคการพ่นสาร.....88
ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูสำคัญในคะน้า
โดย นางจีรนุช เอกอำนวย และคณะ
- ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดแมลงศัตรู.....101
สำคัญในถั่วเขียว
โดย นายสุเทพ สหายา และคณะ
- ทดสอบประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดบั่วกล้วยไม้.....106
Contarinia maculipennis Felt ในกล้วยไม้
โดย นายสมรวย รวมชัยอภิกุล และคณะ
- ศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชในการควบคุม…….111
โรคลำต้นไหม้
โดย นางสาวศรีสุข พูนผลกุล และคณะ
- ทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด……118
แมลงศัตรูที่สำคัญในมันสำปะหลัง
โดย นายสุเทพ สหายา และคณะ

- ทดสอบประสิทธิภาพสารป้องกันกำจัดไรศัตรูสำคัญ.....131
ในมันสำปะหลัง
โดย นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ
- ประสิทธิภาพของสารควบคุมไส้เดือนฝอย เพื่อป้องกันกำจัด.....134
โรครากปมในฝรั่ง
โดย นางสาวฐิติยา สารพัฒน์ และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาการจัดการศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ 07-01-49-02

กิจกรรม การจัดการศัตรูพืชสำคัญของพริก

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคแอนแทรคโนสของพริก

การทดลอง - การใช้สารธรรมชาติและชีวินทรีย์ป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนส.....139
ของพริก
โดย นางสาวอรพรรณ วิเศษสังข์ และคณะ
- ประสิทธิภาพของวิธีการพ่นสารเพื่อป้องกันกำจัด.....146
โรคแอนแทรคโนสในพริก
โดย นางจีรนุช เอกอำนวย และคณะ
- การทดสอบรูปแบบการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสของพริก.....157
แบบผสมผสาน
โดย นางสาวอรพรรณ วิเศษสังข์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคเหี่ยวของพริก

การทดลอง - การจัดการโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.....163
โดย นางสาวอรพรรณ วิเศษสังข์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการแมลงวันผลไม้ในพริก

การทดลอง - การใช้เหยื่อโปรตีน เพื่อป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ในพริก.....169
โดย นางสาววิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการเพลี้ยไฟพริก

การทดลอง - ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการพ่นสารแบบต่าง ๆ 177
ในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟศัตรูพริก
โดย นายพฤทธิชาติ ปุญวัฒโท และคณะ

กิจกรรม การจัดการโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง

การทดลอง - การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....187
ในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ของหน่อไม้ฝรั่ง
โดย นางสาวทัศนาพร ทัศคร และคณะ

- ศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดที่มีต่อเชื้อรา.....197
Trichoderma spp. ในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นไหม้ของ
หน่อไม้ฝรั่ง
โดย นางสาวทัศนาพร ทัศคร และคณะ

กิจกรรม การจัดการศัตรูสำคัญในมะม่วง

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

การทดลอง – การจัดการโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์.....211
โดย นางนลินี ศิวากรณ์ และคณะ

- ศึกษาและพัฒนาวิธีการพ่นสารเพื่อป้องกันกำจัด.....218
โรคแอนแทรคโนสในมะม่วง
โดย นายดำรง เวชกิจ และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการแมลงวันผลไม้ในมะม่วง

การทดลอง - การศึกษาชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพการกินของแมงมุม.....222
ตัวห้ำต่อแมลงวันผลไม้ในสวนมะม่วง
โดย นางวิภาดา วังศิลาบัตร และคณะ

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชและ.....255
น้ำมันปิโตรเลียมเพื่อยับยั้งการวางไข่ของแมลงวันผลไม้ในมะม่วง
โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

- ศึกษาความหนาแน่นและช่วงฤดูการระบาดของแมลงวันผลไม้.....270
ในมะม่วง
โดย นายเกรียงไกร จำเริญมา และคณะ

กิจกรรม การจัดการด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นในทุเรียน

กิจกรรมย่อย การจัดการด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นในทุเรียน

การทดลอง - ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาว.....286
เจาะลำต้นทุเรียนในระยะหนอน
โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

- ศึกษาเทคนิคการป้องกันกำจัดตัวเต็มวัยด้วงหนวดยาว.....292
เจาะลำต้นทุเรียนอย่างเหมาะสมในสภาพสวน
โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ
- การศึกษาประสิทธิภาพกับดักแสงไฟสีต่าง ๆ เพื่อดึงดูด.....296
ตัวเต็มวัยด้วงหนวดยาวทำลายทุเรียน
โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ
- การศึกษาประสิทธิภาพของสารชีวินทรีย์ในการป้องกันกำจัด.....300
ด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นทุเรียนในระยะหนอน
โดย นายศรุต สุทธิอารมณ์ และคณะ

กิจกรรม การจัดการศัตรูสำคัญของฝรั่ง

กิจกรรมย่อย การจัดการแมลงวันผลไม้ฝรั่ง

การทดลอง - การใช้เหยื่อโปรตีนเพื่อป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ในฝรั่ง.....304
โดย นางสาววิภาดา ปลอดครบุรี และคณะ

กิจกรรม การจัดการศัตรูสำคัญของปาล์มน้ำมัน

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน

การทดลอง - การใช้สารไคโตซานในการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่า.....317
ของปาล์มน้ำมัน
โดย นางสาวธารทิพย ภาสบุตร และคณะ

กิจกรรม การจัดการศัตรูสำคัญของลำไย

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคราน้ำฝนของลำไย

การทดลอง - การจัดการโรคราน้ำฝนของลำไย.....326
โดย นางอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการวัชพืชของลำไย

การทดลอง - การจัดการวัชพืชของลำไย.....339
โดย นางสาวจรัญญา ปิ่นสุภา และคณะ

กิจกรรม การจัดการศัตรูสำคัญของชมพู่

กิจกรรมย่อย การจัดการศัตรูสำคัญของชมพู่

การทดลอง - การศึกษาชนิดของแมลงวันผลไม้ศัตรูธรรมชาติและฤดู.....349
การระบาดของแมลงวันผลไม้ที่สำคัญในแหล่งปลูกชมพู่
โดย นางสาวสัญญาณี ศรีคชา และคณะ

- การใช้เหยื่อโปรตีนเพื่อป้องกันกำจัดแมลงวันผลไม้ในชมพู่.....363
โดย นางสาวสัญญาณี ศรีคชา และคณะ

กิจกรรม การจัดการด้านวัชพืช

กิจกรรมย่อย การจัดการด้านวัชพืช

การทดลอง - ศึกษาการจัดการวัชพืชในพืชผักสวนครัว.....367

● การจัดการวัชพืชในโหระพา (*Ocimum basilicum* L.)

โดย นางเสริมศิริ คงแสงดาว และคณะ

กิจกรรม การจัดการศัตรูสำคัญของปทุมมา

กิจกรรมย่อย การจัดการศัตรูสำคัญของปทุมมา

การทดลอง - การจัดการโรคเหี่ยวของปทุมมาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.....378
Ralstonia solanacearum

โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

กิจกรรม การจัดการโรคสำคัญของข้าวโพด

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคสำคัญของข้าวโพด

การทดลอง - การควบคุมโรคใบไหม้แผลใหญ่โดยชีววิธี.....383

โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

- ปฏิกิริยาพันธุ์ข้าวโพดต่อโรคใบไหม้แผลใหญ่.....392

โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์ 07-01-49-03

กิจกรรม ศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์

กิจกรรมย่อย ศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์

การทดลอง - ผลของสารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชต่อผึ้งพันธุ์.....402

โดย นางสาวพวงผกา อ่างมณี และคณะ

- การทดสอบความเป็นพิษของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช.....406
ชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อไรตัวห้ำ

โดย นางสาวมานิตา คงชื่นสิน และคณะ

- ผลกระทบของสารฆ่าแมลงที่มีต่อมวนเพชฌฆาต.....412
Sycanus versicolor Dohm.
โดย นางรัตนา นชะพงษ์ และคณะ
- ระดับความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงต่อหนอนใยผัก 425
Plutella xylostella (Linneaus) จากพื้นที่ปลูกสำคัญ 3 แห่ง
โดย นายสุภราดา สุคนธาภิรมย์ ณ พัทลุง และคณะ
- ทดสอบความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงที่มีผลต่อแมงมุม.....435
ตาหกเหลี่ยมในสวนมะม่วง
โดย นายพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ และคณะ
- ผลกระทบของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อมวนพิฆาต.....446
Eocanthecona furcellata (Wolff)
โดย นางรัตนา นชะพงษ์ และคณะ
- ทดสอบผลของสารป้องกันกำจัดแมลงต่อแตนเบียน.....460
ควบคุมแมลงดำหนามมะพร้าว
โดย นางรจนา ไวยเจริญ และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาการบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน 07-01-49-04

กิจกรรม การบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน

กิจกรรมย่อย การบริหารศัตรูพืชแบบผสมผสาน

การทดลอง - การบริหารศัตรูลำไยแบบผสมผสาน.....469
โดย นางอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ และคณะ
- การบริหารศัตรูส้มโอแบบผสมผสาน.....477
โดย นางสาวสุพัตรา อินทวิมลศรี และคณะ
- การบริหารศัตรูกล้วยไม้โดยวิธีผสมผสาน.....483
โดย นายทวีศักดิ์ ชโยภาส และคณะ
- การบริหารศัตรูส้มเขียวหวานแบบผสมผสาน.....493
โดย นางศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ
- การจัดการศัตรูขิงแบบผสมผสาน.....503
โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

โครงการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชทดแทนสารเคมี 07-01-49-05

กิจกรรม วิจัยเทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย วิจัยเทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง - วิจัยการใช้หนอนตายหยากและหางไหล เพื่อกำจัดสัตว์ศัตรูพืช

- วิจัยการใช้หนอนตายหยากและหางไหล 508
  เพื่อกำจัดหนูศัตรูพืช
  โดย นางกรแก้ว เสือสะอาด และคณะ
- ศึกษาการใช้หนอนตายหยากและหางไหล 516
  เพื่อกำจัดหอยเชอรี่และหอยทากบก
  โดย นายปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

- เปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดลำโพง มะขามและ.....528
  ประคำดีควายกับหอยเชอรี่
  โดย นางสาวชมพูนุท จรรยาเพศ และคณะ

กิจกรรม วิจัยเทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชควบคุมวัชพืช

กิจกรรมย่อย วิจัยเทคโนโลยีการผลิตและการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมวัชพืช

การทดลอง - วิจัยและพัฒนาสารจากแมงลักป่า เพื่อการป้องกันกำจัดวัชพืช.....534
โดย นางสาวจรัญญา ปิ่นสุภา และคณะ

โครงการวิจัย การผลิตและการใช้ชีวภาพและชีวินทรีย์ 07-01-49-06

กิจกรรม การผลิตและการใช้แมลงและไรศัตรูธรรมชาติควบคุมศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้แมลงเบียนควบคุมศัตรูพืช

การทดลอง - การเพาะเลี้ยงแตนเบียนชนิด *Tetrastichus brontispae* 549
Ferriere เพื่อใช้ควบคุมแมลงดำหนามมะพร้าว
โดย นางรจนา ไวยเจริญ และคณะ

- ศึกษาการใช้และประเมินประสิทธิภาพศัตรูธรรมชาติ.....557
  ในการควบคุมแมลงดำหนามมะพร้าว
  โดย นางประภัสสร เชยคำแหง และคณะ

- การศึกษาศักยภาพการผลิตและการใช้ประโยชน์.....561
จากแมลงช้างปีกใส *Mallada basalis* (Walker) และ
Plesiochrysa ramburi (Schneide) ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช
โดย นางประภัสสร เชยคำแหง และคณะ
- ศึกษาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงด้วงเต่าตัวห้ำเพื่อใช้.....571
ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี
โดย นางรจนา ไวยเจริญ และคณะ
- เปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมแมลงศัตรูพืช.....577
ของแมลงช้างปีกใสสกุล *Mallada* sp. และ *Plesiochrysa* sp.
ในห้องปฏิบัติการ
โดย นางประภัสสร เชยคำแหง และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้แมลงและไรตัวห้ำควบคุมศัตรูพืช

การทดลอง - การใช้ไรตัวห้ำควบคุมเพลี้ยไฟและไรศัตรูพืช.....582
โดย นางสาวมานิตา คงชื่นสิน และคณะ

กิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง - การคัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูง.....603
ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม
โดย นายอิศเรส เทียนทัด และคณะ
- การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bt. และไวรัส NPV.....606
เพื่อควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายในทานตะวัน
โดย นายอิศเรส เทียนทัด และคณะ
- การใช้สูตรผสมของ *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับไวรัส 609
Se NPV และ Ha NPV รูปสารแขวนลอยเข้มข้น (Flowable liquid)
เพื่อควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูหน่อไม้ฝรั่ง
โดย นายอิศเรส เทียนทัด และคณะ
- การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย 612
Bacillus thuringiensis ที่ผลิตด้วยวิธีการมาตรฐาน
และวิธีการผลิตแบบพื้นบ้าน
โดย นายอิศเรส เทียนทัด และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง - การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV เพื่อควบคุมหนอนกระทู้ผัก.....615
โดย นางสาวอัจฉรา ตันติโชดก และคณะ

- รูปแบบการผลิตขยายไวรัส NPV หนอนกระทู้ผัก.....618
ในระดับอุตสาหกรรม
โดย นางสาวอัจฉรา ตันติโชดก และคณะ

- การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV 624
ของหนอนกระทู้หอมจากเซลล์เพาะเลี้ยง
โดย นางสาวสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และคณะ

- การศึกษาประสิทธิภาพและกรรมวิธีการอบแห้งไวรัส NPV 631
กำจัดหนอนกระทู้ผัก
โดย นายสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี และคณะ

- พัฒนาการผลิตไวรัส Se MNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง 635
เป็นปริมาณมาก
โดย นางสาวสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และคณะ

- การพัฒนาสูตรอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอน เพื่อผลิตเชื้อ.....641
ไวรัส เอ็น พี วี
โดย นายสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง - การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียว 646
Metarhizium anisopliae
โดย นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ

- การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวมัสคาดีน *Metarhizium* 663
anisopliae ในรูปแบบผงในห้องปฏิบัติการ
โดย นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลอง - วิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทน.....684
อุณหภูมิสูง เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช
โดย นางสาววิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ

- คัดเลือกและพัฒนาไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ท้องถิ่น.....690
Steinernema siamkayai
โดย นางสาววิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
- การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยสูตรผง.....697
ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช
โดย นายสาทิพย์ มาลี และคณะ
- ศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อความอยู่รอดและประสิทธิภาพ.....706
ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
โดย นายสาทิพย์ มาลี และคณะ
- การศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการควบคุม…....712
หนอนผีเสื้อศัตรูหน่อไม้ฝรั่งเพื่อการส่งออก
โดย นายสาทิพย์ มาลี และคณะ
- ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการควบคุม.....719
หนอนแมลงวันศัตรูในเห็ด
โดย นางสาววิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ
- ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลาย.....724
แมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*
โดย นางสาววิไลวรรณ เวชยันต์ และคณะ

กิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมสัตว์ศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย โรงงานต้นแบบการผลิตขยายสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูในเชิงพาณิชย์

การทดลอง - ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตขยายเชื้อโปรโตซัว……..…727
ในงูเหลือมสภาพโรงเรือน
โดย นางสาวยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และคณะ
- ศึกษาสายพันธุ์หนูที่เหมาะสมต่อการผลิตขยาย.....731
เชื้อโปรโตซัวในหนูในสภาพโรงเรือน
โดย นางสาวยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และคณะ
- ศึกษาวิธีการควบคุมคุณภาพการผลิตสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว.....734
S. singaporensis
โดย นางสาวยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และคณะ

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนารูปแบบเหยื่อที่เหมาะสมต่อการผลิตเหยื่อโปรโตซัว ในเชิงธุรกิจ

- ศึกษาสูตรอาหารและรูปแบบใหม่ของเหยื่อโปรโตซัว.....738

โดย นางสาวดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

- ศึกษาระยะเวลา การเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่.....750

โดย นางสาวดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

- ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ใน.....756

การป้องกันกำจัดหนู

โดย นางสาวดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การใช้จุลินทรีย์ควบคุมหอยทากบกและหอยเชอรี่ศัตรูพืช

- คัดเลือกสายพันธุ์บาซิลลัสและทดสอบประสิทธิภาพควบคุม.....761

หอยเชอรี่และหอยทากบก

โดย นายปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

- คัดเลือกสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยและทดสอบ..... 774

ประสิทธิภาพควบคุมหอยทากบกและหอยเชอรี่

โดย นายปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

กิจกรรมย่อย การพัฒนาผลิตภัณฑ์แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

การทดลอง - การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์.....782

Bacillus subtilis ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การผลิตเชื้อปฏิปักษ์เพื่อควบคุมศัตรูพืช

- การผลิตเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคเหี่ยวของมันฝรั่งปริมาณมาก.....808

เพื่อเกษตรกร

โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

- การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศโดยชีววิธี.....813

โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

- การทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวินทรีย์ในการควบคุมโรค.....822

รากปมในแปลงสาธิต

โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ

โครงการวิจัย การกักกันพืช 07-01-49-07

กิจกรรม การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อย การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ

การทดลอง - ศึกษาชนิดแมลง สัตว์ศัตรูพืชส่งออก 831
(หน่อไม้ฝรั่ง และถั่วลันเตา) และพืชนำเข้า (พืชตระกูลแตงและ
พืชตระกูลกะหล่ำ)

โดย นางศิริณี พูนไชยศรี และคณะ

- การศึกษาชนิดของโรคพืชของพืชส่งออก หน่อไม้ฝรั่ง 844
และถั่วลันเตา พืชนำเข้า ได้แก่ พืชตระกูลแตง และพืชตระกูลกะหล่ำ

โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

- การศึกษาชนิดวัชพืชในพืชส่งออกและพืชนำเข้า

● การศึกษาชนิดวัชพืชในพืชส่งออก : หน่อไม้ฝรั่ง..... 850

โดย นางจันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ และคณะ

● การศึกษาชนิดวัชพืชในพืชส่งออก : ถั่วลันเตา.....864

โดย นางจันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

การทดลอง - การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของพืชนำเข้า

● การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยง.....875
เชื้อ *Spongospora subterranea* ติดมากับหัวพันธุ์
มันฝรั่ง

โดย นางสาวปรียพรรณ พงศาพิชณ์ และคณะ

● การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช.....896
ขององุ่นนำเข้าจากประเทศชิลี

โดย นางสาวชลธิชา รักใคร่ และคณะ

● การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช.....902
ขององุ่นนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย

โดย นายอลงกต โพธิ์ดี และคณะ

● การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช.....906
ขององุ่นนำเข้าจากประเทศอินเดีย

โดย นายอลงกต โพธิ์ดี และคณะ

● การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช.....910
สำหรับการนำเข้าแครอท
โดย นางสาวสุคนธ์ทิพย์ สมบัติ และคณะ
● การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช.....925
ของเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากต่างประเทศ
โดย นางสาวนงพร มาอยู่ดี และคณะ

กิจกรรมย่อย ศึกษาศัตรูพืชกักกันที่ติดมากับพืชนำเข้า

การทดลอง - การศึกษาชนิดไรศัตรูพืชในหัวหอมและกระเทียมที่นำเข้า.....932
จากประเทศจีน
โดย นางสาวพลอยชมพู กรวิภาสเรือง และคณะ
- การศึกษาชนิดศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ.....945
นำเข้าจากต่างประเทศ
โดย นางสาวชลธิชา รักใคร่ และคณะ
- การศึกษาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่..... 950
นำเข้าจากต่างประเทศ
โดย นายวานิช คำพานิช และคณะ

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชกักกัน

การทดลอง - พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์กับส่วนขยายพันธุ์.....964
ของส้ม
โดย นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ และคณะ

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดศัตรูพืชกักกัน

การทดลอง - วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและวิธีกำจัดแมลง.....981
ด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในลำไยเพื่อการส่งออก
โดย นางสลักจิต พานคำ และคณะ
- วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและวิธีกำจัดแมลง.....988
ด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลิ้นจี่
เพื่อการส่งออก
โดย นางสาวรัชฎา อินทรกำแหง และคณะ

- วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัด.....995
แมลงวันทองในมะม่วงพันธุ์มหาชนก โชคอนันต์ และเขียวเสวย
เพื่อการส่งออก
โดย นางสาวรัชฎา อินทรกำแหง และคณะ
- วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัด.....1003
แมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา
เพื่อการส่งออก
โดย นายอุดร อุณหวุฒิ และคณะ
- วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและวิธีกำจัด.....1013
แมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลเงาะ
เพื่อการส่งออก
โดย นางสลักจิต พานคำ และคณะ
- การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ.....1020
Acidovorax avenae subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์
พืชสกุลแตงบางชนิดเพื่อการส่งออก
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีชาติ และคณะ

โครงการวิจัย การเฝ้าระวังศัตรูพืช 07-01-51-01

กิจกรรม การเฝ้าระวังเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมย่อย การเฝ้าระวังเชื้อสาเหตุโรคพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน

การทดลอง - การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของรา *Guignardia*.....1042
citricarpa สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ
โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของเชื้อรา *Guignardia citricarpa* 1049
สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ : การเข้าทำลายของรา *Guignardia*
citricarpa สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ
โดย นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ
- การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของรา *Sclerophthora* ... 1057
rayssiae และ *S. macrospora* สาเหตุโรคน้ำค้างของข้าวโพด
โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

- การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของแบคทีเรีย..... 1062
Pantoea stewartii
โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย.....1067
Acidovorax avenae subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืช
ตระกูลแตง
โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ
- ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* 1077
subsp *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง : การมีชีวิตรอด
การอาศัยอยู่ และการศึกษาจำนวนประชากรแบคทีเรีย *A. avenae*
subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงในดินและน้ำจากแหล่งปลูก
โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย *Radopholus*.....1087
similis ในไม้น้ำและไม้ดอกไม้ประดับ
โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ
- ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอย *Radopholus* 1100
similis ในไม้น้ำและไม้ดอกไม้ประดับ
โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ
- การเฝ้าระวังโรคไวรัสของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ OFV, TRSV 1109
และ Potyvirus
โดย นายสิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ

กิจกรรม การเฝ้าระวังแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน

กิจกรรมย่อย การเฝ้าระวังแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกัน

การทดลอง - การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง 1116
Sternochetus mangiferae ในมะม่วง
โดย นางสาวสราญจิต ไกรฤกษ์ และคณะ

- การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของหนอนเจาะผล, ... ……..……1126
Cryptophalebia ombrodelta (Lower) ในลำไย
โดย นางสาวบุษบง มนัสมั่นคง และคณะ
- สถานการณ์การแพร่กระจายของเพลี้ยแป้ง *Cataenococcus*……..... 1134
hispidus Green และ *Planococcus lichi* Cox ในลำไย
โดย นางศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ

กิจกรรม การเฝ้าระวังวัชพืช

กิจกรรมย่อย การเฝ้าระวังวัชพืช

การทดลอง - เฝ้าระวังการแพร่กระจายของ *Conyza canadensis* ……..…1144
(L.) Cronq. ในประเทศไทย
โดย นางจันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ และคณะ
- การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของ *Euphorbia dentata* ……..…1155
และ *Agrostis* spp. ในพืชไร่
โดย นายคมสัน นครศรี และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย วิจัยชีวโมเลกุล (Molecular biology) **ในการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมพืช จุลินทรีย์ การปรับปรุงพันธุ์ และการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์** 09-01-49-02

กิจกรรม วิจัยชีวโมเลกุล (Molecular biology) **ในการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมพืช และจุลินทรีย์**

กิจกรรมย่อย วิจัยชีวโมเลกุลในการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมจุลินทรีย์

การทดลอง - ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรม.....1163
รา *Fusarium* spp. ในประเทศไทย
โดย นางสาวธารทิพย ภาสบุตร และคณะ
- ลายพิมพ์ดี เอ็น เอ และความหลากหลายทางพันธุกรรม.....1177
รา *Phytophthora parasitica*
โดย นางอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ และคณะ
- ลายพิมพ์ดี เอ็น เอ ของเชื้อรา *Phytophthora capsici*.....1203
สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก
โดย นางสาวศรีสุข พูนผลกุล และคณะ

กิจกรรม วิจัยชีวโมเลกุล (Molecular biology) ในการตรวจสอบ

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อเฝ้าระวัง และควบคุมคุณภาพสินค้าเกษตร

การทดลอง - การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้มโดยใช้.....1211
ระบบเซลล์แบคทีเรีย
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ

- การผลิตแอนติซีรัมจากไก่ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptomyces* 1230
scabies สาเหตุโรคแผลสะเก็ดของมันฝรั่ง และการตรวจหา
เชื้อนี้จากหัวพันธุ์นำเข้าและมันฝรั่งที่ผลิตได้ในประเทศ
โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

- การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Pineapple mealybug* 1236
Wilt-associated virus-2 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรด
โดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ

- การตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัส.....1254
กลุ่ม Potyvirus
โดย นายสิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ

- วิธีการตรวจสอบราสาเหตุโรค Black spot ของส้มโอ.....1263
โดยเทคนิค PCR
โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

- การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax*.....1274
Ovenae subsp. *catleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้
โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ

- การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน 1284
ของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว
โดย นางจรรยา มณีโชติ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาทุเรียน

โครงการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน 01-09-49-02

กิจกรรม วิจัยเทคโนโลยีการผลิตทุเรียน

กิจกรรมย่อย การป้องกันศัตรูทุเรียนแบบผสมผสานเพื่อผลิตทุเรียนคุณภาพ

การทดลอง - ศึกษาการควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน.....1308
โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์
โดย นางนลินี ศิวากรณ์ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาสับปะรด

โครงการวิจัย การวิจัยศึกษาระบบการผลิตสับปะรด 01-08-49-01

กิจกรรม ศึกษาระบบการผลิตสับปะรดเพื่อแก้ปัญหาโรคเหี่ยวของสับปะรด

กิจกรรมย่อย ศึกษาการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อแก้ปัญหาโรคเหี่ยวของสับปะรด

การทดลอง - การถ่ายทอดโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเพลี้ยแป้ง.....1318
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ
- การคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดจากไวรัส.....1326
สาเหตุโรคเหี่ยว
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมพืช 09-02-49-01

กิจกรรม สำรวจ รวบรวมและศึกษาเชื้อพันธุกรรมพืช

กิจกรรมย่อย การสำรวจ รวบรวมและศึกษาชนิดวัชพืชในพืชเศรษฐกิจ

การทดลอง - การสำรวจและรวบรวมวัชพืชในมันฝรั่ง.....1336
โดย นางจันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์และคณะ
- การสำรวจและรวบรวมวัชพืชในมันสำปะหลัง.....1349
โดย นางจันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเพื่อการอนุรักษ์จุลินทรีย์และเห็ด 09-02-49-01

กิจกรรม สำรวจ รวบรวม จำแนก และหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร

กิจกรรมย่อย สำรวจ รวบรวม จำแนกและหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร

การทดลอง - การจำแนกและคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่มีผลต่อการงอกของ.....1370
กล้วยไม้
โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช.....1387
โดย นางสาวชนินทร ดวงสะอาด และคณะ

- การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus* spp.....1395
ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv.
dieffenbachiae สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว
โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ
- การอนุรักษ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช
● ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* 1405
carotovora
โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ
- การอนุรักษ์จุลินทรีย์ผลิตสารชีวภัณฑ์ และมีศักยภาพในการป้องกัน
กำจัดโรคศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ
● ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง.....1409
โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ

กิจกรรม สำรวจ รวบรวม จำแนก และหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

กิจกรรมย่อย สำรวจ รวบรวม จำแนกและหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

การทดลอง - สำรวจ รวบรวม และจำแนกราเขม่าดำ.....1417
โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกราสกุล *Cercosporoid*.....1437
fungi และ Teleomorph
โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกรา *Fusarium*.....1445
สาเหตุโรคพืช
โดย นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* spp. 1464
โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกรา *Phythium* 1476
สาเหตุโรคพืช
โดย นางอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราแป้งสาเหตุโรคพืช.....1489
โดย นายยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ

- สำรวจ รวบรวม จำแนก และศึกษาพืชอาศัยของรา.....1494
Sclerotium spp. สาเหตุโรคพืช
โดย นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกราสกุล *Macrophomina*.....1505
สาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ
โดย นางสาวพจนา ตระกูลสุขรัตน์ และคณะ
- สำรวจ รวบรวม และจำแนกแบคทีเรีย *Xanthomonas*.....1512
campestris สาเหตุโรคเน่าดำของพืชตระกูลกะหล่ำและผักกาด
โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ
- การสำรวจ และรวบรวมเชื้อไวรอยด์ของพืชตระกูลส้ม.....1530
โดย นางสาวนภสร ปุญญพิทักษ์ และคณะ
- สำรวจ และจำแนกเชื้อโรคกรีนนิ่งในประเทศไทยด้วยเทคนิค.....1537
ทางอนูชีววิทยา
โดย นางสาวนภสร ปุญญพิทักษ์ และคณะ
- ฐานข้อมูลเชื้อราสาเหตุโรคพืชใน Culture Collection.....1542
โดย นายยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และคณะ
- เทคนิคการเก็บรักษารา *Colletotrichum* spp. 1547
โดย นางสาวธารทิพย ภาสบุตร และคณะ

กิจกรรม สำรวจ รวบรวม จำแนก และหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ผลิตสารชีวภัณฑ์และมีศักยภาพในการป้องกันกำจัดโรคศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย สำรวจ รวบรวม จำแนกและหาเทคโนโลยีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ผลิตสารชีวภัณฑ์และมีศักยภาพในการป้องกันกำจัดโรคศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

การทดลอง - สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย.....1563
ควบคุมแมลงศัตรูพืช
โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ
- สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus*
ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช

● ศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มีศักยภาพ.....1577
ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ
โดย นางสาวบุษราคัม อุดมศักดิ์ และคณะ
- การสำรวจ และรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* 1606
thuringiensis และเชื้อไวรัส NPV
โดย นายอิศเรส เทียนทัด และคณะ
- การสำรวจ รวบรวม ตรวจจำแนกสายพันธุ์ปรสิตโปรโตซัว.....1609
โดย นางสาวยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเพื่อการอนุรักษ์แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติ 09-02-49-01

กิจกรรม สำรวจ รวบรวม จำแนกชนิดแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย สำรวจ รวบรวม จำแนกชนิดแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

การทดลอง - อนุกรมวิธานแมลงศัตรูที่พบในสบู่ดำ.....1612
โดย นางศิริณี พูนไชยศรี และคณะ
- อนุกรมวิธานของแมลงศัตรูที่พบในเบญจมาศ.....1615
โดย นางชลิดา อุณหวุฒิ และคณะ
- อนุกรมวิธานแมลงศัตรูที่พบในไม้ดอกสกุล *Curcuma*.....1619
(ปทุมมา และกระเจียว)
โดย นางสาวสุนัดดา เชาวลิต และคณะ
- อนุกรมวิธานเพลี้ยแป้งสกุล *Pseudococcus* 1623
โดย นางชลิดา อุณหวุฒิ และคณะ
- อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนวงศ์ย่อย Aphidinae 1627
โดย นางลักขณา บำรุงศรี และคณะ
- อนุกรมวิธานของแมลงวันผลไม้สกุล *Bactrocera*.....1631
โดย นางสาวยุวรินทร์ บุญทบ และคณะ
- การศึกษาชนิดแมลงหายากใกล้สูญพันธุ์.....1642
โดย นางศิริณี พูนไชยศรี และคณะ
- ชีววิทยาหอยเจดีย์ใหญ่ 1656
โดย นางสาวปิยาณี หนูกาฬ และคณะ

- สำรวจ และศึกษาชนิดหนูศัตรูพืชในระบบนิเวศ.....1659
ปาล์มปลูกใหม่
โดย นางกรแก้ว เสือสะอาด และคณะ
- อนุกรมวิธานด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง *Sternochelus* spp. ……..1666
โดย นางศิริณี พูนไชยศรี และคณะ

กิจกรรม เทคโนโลยีการเก็บรักษาแมลง ไร สัตว์ศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย การเก็บรักษาตัวอย่างแมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช และศัตรูธรรมชาติในพิพิธภัณฑ์

การทดลอง - การเก็บรักษาตัวอย่างแมลงในพิพิธภัณฑ์……..1670
โดย นางศิริณี พูนไชยศรี และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนากลุ่มพืชสมุนไพร

โครงการวิจัย ศึกษาการผลิตฟ้าทะลายโจร 01-12-49-06

กิจกรรม วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีกระบวนการผลิตการเก็บเกี่ยวและแปรรูปฟ้าทะลายโจร

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเขตกรรมเพื่อเพิ่มคุณภาพและสารสำคัญฟ้าทะลายโจร

การทดลอง - วิจัยและพัฒนาการกำจัดศัตรูพืชและการกำจัดวัชพืช……..1676
ในฟ้าทะลายโจร
โดย นางสาวเพ็ญศรี นันทสมสราญ และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนากลุ่มพืชผัก และเห็ด

โครงการวิจัย ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตพริก 01-16-49-01

กิจกรรม เทคโนโลยีการผลิตพริก

กิจกรรมย่อย การจัดการศัตรูพริก

การทดลอง - การบริหารจัดการโรคใบหงิกเหลืองของพริก.....1693
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ
- การควบคุมโรครากปมสาเหตุจากไส้เดือนฝอยในสภาพ……..1701
แปลงปลูกของเกษตรกร : การคัดพันธุ์ต้านทานพริกต้านทานโรครากปม
โดย นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และคณะ
- การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของพริกโดยชีววิธี.....1712
โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ

- ศึกษากลไกความต้านทานของพริกต่อโรคลำต้นไหม้ที่เกิดจาก.....1719
เชื้อรา *Phytopthora capsici*
โดย นางสาวศรีสุข พูนผลกุล และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตกระเจี๊ยบเขียว 01-16-49-02
กิจกรรม เทคโนโลยีการผลิตกระเจี๊ยบเขียว
กิจกรรมย่อย การป้องกันกำจัดศัตรูกระเจี๊ยบเขียวในการผลิตเพื่อผลผลิตที่ปลอดจากสารพิษ
การทดลอง - ความสัมพันธ์ของไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองกับพันธุ์.....1726
กระเจี๊ยบเขียวในแต่ละแหล่งปลูก
โดย นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตเห็ด 01-16-49-03
กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์เห็ด
กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์เห็ดตีนแรด
การทดลอง - การทดสอบสายพันธุ์เห็ดตีนแรดเพื่อเป็นพันธุ์ทางการค้า.....1734
โดย นางอัจฉรา พยัพพานนท์ และคณะ
- ทดสอบสายพันธุ์เห็ดตีนแรดที่ผลิตสารโพลีแซคคารายด์.....1754
ที่เป็นประโยชน์
โดย นางอัจฉรา พยัพพานนท์ และคณะ
กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์เห็ดที่มีศักยภาพ
การทดลอง - การประเมินสายพันธุ์เห็ดต่งฝนเพื่อการใช้ประโยชน์.....1764
โดย นางสุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และคณะ.
- รวบรวม และคัดเลือกพันธุ์เห็ด *Oudemansiella* spp. 1769
จากแหล่งต่าง ๆ เพื่อเป็นพันธุ์ทางการค้า
โดย นางอัจฉรา พยัพพานนท์ และคณะ.
กิจกรรม การเขตกรรมและการจัดการผลิตเห็ด
กิจกรรมย่อย กระบวนการผลิตเห็ดฟาง
การทดลอง - กระบวนการผลิตปุ๋ยหมักเพื่อเพาะเห็ดฟางคุณภาพ.....1777
โดย นางอัจฉรา พยัพพานนท์ และคณะ.
กิจกรรมย่อย กระบวนการผลิตเห็ดนางรม
การทดลอง - การใช้ฟางข้าวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเห็ดนางรม.....1786
โดย นางสุวลักษณ์ ชัยชูโชติ และคณะ

กิจกรรม การพัฒนาเทคโนโลยีการอารักขาเห็ด

กิจกรรมย่อย การศึกษาชีววิทยาและการป้องกันกำจัดไร *Dolichocybe indica* Mahunka ในเห็ดยานางิ

การทดลอง - การศึกษาชีววิทยาและการป้องกันกำจัดไรลูกโป่ง.....1793
Dolichocybe indica Mahunka ในเห็ดโดยการใช้สารฆ่าไร
โดย นายเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การป้องกันกำจัดแมลงหางดีดในเห็ด

การทดลอง - การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา และการป้องกันกำจัดแมลง.....1805
หางดีดในเห็ด
โดย นางอุราพร หนูนารถ และคณะ

กิจกรรมย่อย การป้องกันกำจัดไรดีดในเห็ด

การทดลอง - การแก้ปัญหาไรดีดในพื้นที่เพาะเห็ดนางรมฮังการี.....1808
ภาคกลางของประเทศไทย
โดย นายเทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และคณะ
- การศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา และเขตการแพร่กระจาย.....1811
ของหนอนแมลงวันเชียริดแมลงศัตรูเห็ดที่สำคัญ
โดย นางสาวสัญญาณี ศรีคชา และคณะ
- การศึกษาวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูเห็ดที่สำคัญ.....1815
โดย นางอุราพร หนูนารถ และคณะ
- ศึกษาเทคนิคการพ่นสารเพื่อป้องกันกำจัดแมลงและไรศัตรูเห็ด.....1818
โดย นายพฤทธิชาติ ปุญวัฒโท และคณะ

กิจกรรมย่อย เชื้อราสกุล Hypomyces สาเหตุโรคใยแมงมุมบนดอกเห็ดเป๋าฮื้อ และการป้องกันกำจัด

การทดลอง - การป้องกันกำจัดเชื้อราสกุล *Hypomyces* 1831
สาเหตุโรคใยแมงมุมบนดอกเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*)
โดย นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย สาเหตุและการแพร่กระจายของราเมือกที่ทำความเสียหายในการเพาะเห็ดถุงของประเทศไทย

การทดลอง - สาเหตุและการแพร่กระจายของราเมือกที่ทำความเสียหาย.....1838
ในการเพาะเห็ดถุงของประเทศไทย
โดย นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ

กิจกรรมย่อย ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่เข้าทำลายเห็ดที่ผลิตเพื่อการค้า และการป้องกันกำจัด

การทดลอง - การป้องกันกำจัดโรคเน่าสีน้ำตาลของเห็ดนางรม.....1851
ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย กลุ่ม Pseudomonas
โดย นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตมันฝรั่ง 01-16-49-05

กิจกรรม เทคโนโลยีการผลิตมันฝรั่ง

กิจกรรมย่อย การจัดการศัตรูมันฝรั่ง

- ประสิทธิภาพของสาร abamectin ในการควบคุมไส้เดือนฝอย.....1861
รากปมในมันฝรั่ง
โดย นายไตรเดช ข่ายทอง และคณะ
- การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus*.....1868
ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูมันฝรั่ง
โดย นายมนตรี เอี่ยมวิมังสา และคณะ
- ขยายผลการใช้ชุดควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมันฝรั่งใน.....1878
แปลงเกษตรกรโดยชีววิธี
โดย นายวงศ์ บุญสืบสกุล และคณะ
- การจัดการโรคไวรัสของมันฝรั่ง.....1885
  - การสำรวจและจำแนกโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVS, PVX และ PLRV
    โดย นายสิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ
  - การป้องกัน และควบคุมแมลงพาหะของเชื้อไวรัส.....1891
    ในมันฝรั่ง
    โดย นายสิทธิศักดิ์ แสไพศาล และคณะ

โครงการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตขิงที่ได้คุณภาพ 01-16-49-06

กิจกรรม เทคโนโลยีการผลิตขิงคุณภาพ

กิจกรรมย่อย การเขตกรรมและการจัดการผลิตขิงอย่างยั่งยืน

การทดลอง - ศึกษาวิธีการผลิตขิงเพื่อลดการใช้สารเคมีและได้ผลผลิต 1897
ปลอดจากสารพิษตกค้างและศัตรูพืช

● การบริหารจัดการวัชพืชในขิง : ปี 2551

โดย นางสาวเสริมศิริ คงแสงดาว และคณะ

โครงการวิจัย ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตพืชที่มีศักยภาพ 01-16-52-01

กิจกรรม เทคโนโลยีการผลิตมันเทศ

กิจกรรมย่อย การอารักขามันเทศ

การทดลอง - ศึกษาประสิทธิภาพสารกำจัดวัชพืชประเภทก่อนวัชพืชงอก.....1908
ในมันเทศ

โดย นางเสริมศิริ คงแสงดาว และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนากลุ่มไม้ดอกไม้ประดับ

โครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ 01-15-49-01

กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์การค้า

กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย

การทดลอง - วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายคุณภาพดี

● การจัดการโรคเกสรดำในกล้วยไม้สกุลหวายโดยสารเคมี....1916

โดย นางสาวทัศนาพร ทัศคร และคณะ

กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ประเภทแวนด้า

การทดลอง - วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้ประเภทแวนด้าคุณภาพดี

● การทดสอบปฏิกิริยากล้วยไม้ลูกผสมแวนด้า.....1928
พันธุ์การค้าต่อโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ
Phytophthora palmivora

โดย นางสาวทัศนาพร ทัศคร และคณะ

● การควบคุมโรคใบจุดเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนด้า.....1937
โดยชีววิธี

โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้การค้าสกุลอื่น

การทดลอง - การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.....1947

โดย นางปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และคณะ

- การจัดการวัชพืชในกล้วยไม้

● การจัดการดาดตะกั่ว *(Hemigraphis reptans)* 1968
ในกล้วยไม้สกุลหวาย

โดย นางเสริมศิริ คงแสงดาว และคณะ

กิจกรรม การศึกษาศักยภาพกล้วยไม้ไทยในท้องถิ่นต่าง ๆ เพื่อพัฒนาเป็นสินค้าออกใหม่

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้สกุลสแปโทกลอสทิสและสกุลแกรมมะโตฟิลลัม

- ศึกษาโรคและการจัดการโรคกล้วยไม้สกุลสแปโทกลอททิสและสกุลแกรมมะโตฟิลลัม.....1992

โดย นางสาวสุพัตรา อินทวิมลศรี และคณะ

โครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว 01-15-49-02

กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว

กิจกรรมย่อย ปฏิกิริยาของพันธุ์หน้าวัวต่อโรคเน่าดำ

การทดลอง - ปฏิกิริยาของพันธุ์หน้าวัวลูกผสมต่อโรคเน่าดำ.....1996

โดย นางอมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ และคณะ

โครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา/กระเจียว 01-15-49-03

กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์ปทุมมา/กระเจียว

กิจกรรมย่อย การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การทดลอง - การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์.....2009

โดย นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และคณะ

โครงการวิจัย วิจัยเพื่อแก้ไขปัญหาการส่งออกกล้วยไม้ 01-15-52-01

กิจกรรม การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

กิจกรรมย่อย วิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดและควบคุมศัตรูกล้วยไม้

การทดลอง - ศึกษาเทคนิคการพ่นสารเพื่อป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกล้วยไม้บางชนิด.....2021

โดย นายพฤทธิชาติ ปุญวัฒโท และคณะ

- การใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมหอยทากซัคซิเนีย (*Succinea chrysis*)ในสวนกล้วยไม้....2033

โดย นายปราสาททอง พรหมเกิด และคณะ

- ทดสอบและเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดจากใบมะขาม..... 2039
ใบว่านหางจระเข้ ฝักจามจุรี กับหอยซัคซิเนีย และหอยเลขหนึ่ง
โดย นางสาวดาราพร รินทะรักษ์ และคณะ
- ชีววิทยาทาก *Parmarion* sp. 2048
โดย นางสาวปิยาณี หนูกาฬ และคณะ
- ฤดูกาลระบาดของไรแมงมุมเทียมกล้วยไม้, *Tenuipalpus* 2051
pacificus และวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสม
โดย นางสาวมานิตา คงชื่นสิน และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนากลุ่มพืชไร่เศรษฐกิจอื่น ๆ
โครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างหวาน 01-17-49-06
กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์ข้าวฟ่างหวาน
กิจกรรมย่อย การประเมินสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ต้านทานต่อโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา

การทดลอง - ปฏิกิริยาของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ต้านทานต่อโรค.....2056
ช่อดอกไหม้และยอดบิดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา
Fusarium moniliforme
โดย นายอภิรัชต์ สมฤทธิ์ และคณะ
- ปฏิกิริยาของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ต้านทานต่อโรค.....2062
ลำต้นเน่าดำที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Macrophomina*
phaseolina
โดย นางสาวพจนา ตระกูลสุขรัตน์ และคณะ
- ปฏิกิริยาของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ต้านทานต่อโรค.....2067
แอนแทรคโนสที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum*
sublineolum
โดย นางสาวพจนา ตระกูลสุขรัตน์ และคณะ
- ปฏิกิริยาของสายพันธุ์ข้าวฟ่างหวานที่ต้านทานต่อโรคสมัท.....2072
ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sphacelotheca cruenta*
โดย นางพีระวรรณ พัฒนวิภาส และคณะ

โครงการวิจัย การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียว 01-17-49-07

กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวผิวมัน

กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์

การทดลอง ● การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเขียวให้ต้านทานโรคไวรัสใบด่างเหลือง.....2079
ในเรือนทดลอง

โดย นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนากลุ่มไม้ผลเศรษฐกิจอื่น ๆ

โครงการวิจัย วิจัยศึกษาเทคโนโลยีการผลิตแก้วมังกร 01-13-52-03

กิจกรรม ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตแก้วมังกรในและนอกฤดู

กิจกรรมย่อย ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตแก้วมังกรในและนอกฤดู

การทดลอง - ศึกษาการจัดการอารักขาพืชที่เหมาะสมในการผลิตแก้วมังกร.....2088

โดย นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาถั่วเหลือง

โครงการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตถั่วเหลือง 01-06-49-02

กิจกรรม ถั่วเหลือง

กิจกรรมย่อย เทคโนโลยีการอารักขาถั่วเหลือง

การทดลอง - ผลของสารกำจัดวัชพืชและเวลาการใช้ต่อการควบคุม.....2094
วัชพืชในการผลิตถั่วเหลือง

โดย นายคมสัน นครศรี และคณะ

แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาส้มโอ

โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตส้มโอ 01-10-49-02

กิจกรรม การอารักขาส้มโอ

กิจกรรมย่อย การจัดการแมลงศัตรูสำคัญในส้มโอ

การทดลอง - ประสิทธิภาพสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัด.....2105
หนอนเจาะผลส้มโอ, *Citripestis sagittiferella* Moore

โดย นางศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ

- ศึกษาชนิดการเข้าทำลายและการป้องกันกำจัดแมลงวัน.....2120
ผลไม้ในส้มโอ

โดย นางสาวบุษบง มนัสมั่นคง และคณะ

- ศึกษาประสิทธิภาพการห่อผลส้มโอร่วมกับการใช้สารฆ่าแมลง.....2124
ในการป้องกันการเข้าทำลายของหนอนเจาะผลส้มโอ
โดย นางศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา และคณะ

กิจกรรมย่อย การจัดการโรคในส้มโอ

การทดลอง - การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคแคงเกอร์.....2133
ของส้มโอ
โดย นางนลินี ศิวากรณ์ และคณะ
- การใช้พืชสมุนไพรเพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้มโอ.....2140
โดย นางนลินี ศิวากรณ์ และคณะ
- ศึกษาช่วงเวลาการพ่นสารป้องกันกำจัดโรงแคงเกอร์ของส้มโอ.....2146
ให้มีประสิทธิภาพ
โดย นางสาวบูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ
- ศึกษาการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโอ.....2157
โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์
โดย นางนลินี ศิวากรณ์ และคณะ
- การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มโอโดยเชื้อรา.....2169
ไตรโคเดอร์มา
โดย นางสาวสุพัตรา อินทวิมลศรี และคณะ
- การจัดการโรคจุดดำของส้มโอโดยการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช.....2174.
ร่วมกับการเขตกรรม
โดย นางสาวบูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และคณะ

กิจกรรมย่อย การแก้ไขปัญหาลักษณะและอาการผิดปกติของผลส้มโอ

การทดลอง - สาเหตุการเกิดและการป้องกันแก้ไขอาการจุดดาวกระจาย.....2183
บนผลส้มโอ
โดย นางสาวบุษบง มนัสมั่นคง และคณะ

ศึกษาสูตรอาหารและรูปแบบใหม่ของเหยื่อโปรโตซัว

ดาราพร รินทะรักษ์ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ กรแก้ว เสือสะอาด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ทดลองผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ภายในเหยื่อที่ดัดแปลงใหม่ โดยมีส่วนผสมของน้ำมันข้าวโพด : แป้งทัลคัม :เมล็ดข้าวโพดบด :น้ำตาลทราย :แป้งสาลี : อาหารหนูชนิดเม็ด อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10 และเติมสาร xanthan gum ลงไปในเหยื่อรูปแบบใหม่ ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติที่สามารถจับกับน้ำซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในทำให้สปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวมีชีวิตนานขึ้น จากนั้นทดสอบความชอบของหนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) ต่อเหยื่อรูปแบบใหม่ พบว่าหนูท้องขาวบ้านจำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) ชอบกินเหยื่อแป้งนุ่มรูปแบบใหม่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ทำการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay โดยให้เชื้อแก่หนูด้วย feeding tube ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-82 และเบอร์ S -24 จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตของโปโตซัว *S. singaporensis* โดยการย้อมสี nucleic acid พบว่าเชื้อที่อยู่ในสาร xanthan gum นาน 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน,4 เดือน และ 5 เดือน ยังคงมีชีวิต 100%, 100 %, 99%, 96% และ 60% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น ขณะนี้อยู่ระหว่างทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ ที่เก็บไว้นาน 4 เดือน, 5 เดือน และ 6 เดือน และพัฒนารูปแบบที่สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-02-01-51

คำนำ

ประเทศไทย เป็นประเทศเกษตรกรรมที่สามารถผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรหลายชนิด แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาเกี่ยวกับศัตรูพืชที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ พืชผลทางเกษตรกรรมหลายชนิดที่มีประวัติถูกหนูทำลาย โดยเฉพาะพืชในกลุ่มธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น ซึ่งหนูจะทำลายและทำให้เกิดความเสียหายแก่พืชเหล่านี้ได้เกือบทุกระยะ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ความเสียหายของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยที่เกิดจากการทำลายของหนู พบว่าในข้าวความเสียหายเฉลี่ยประมาณ 1.53% ข้าวบาร์เลย์ประมาณ 6.53% ถั่วเหลืองประมาณ 9.1-17.2% อ้อยประมาณ 5.3% ปาล์มน้ำมันประมาณ 36% มะพร้าวประมาณ 8.7% และโกโก้ประมาณ 10% ซึ่งความเสียหายเหล่านี้ ประมาณมูลค่าไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี (เสริมศักดิ์, 2536)

หนูที่พบในประเทศไทยมีทั้งหมด ประมาณ 36 ชนิด ประกอบด้วย 3 สกุล (genus) คือสกุลหนูพุก (*Bandicota*) สกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) สกุลหนูหริ่ง (*Mus*) โดยพบว่าหนูที่เป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ หนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*) หนูพุกเล็ก (*B.savilei*) หนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) หนูนาเล็ก (*R.losea*) หนูท้องขาวบ้าน (*R.rattus*) หนูป่ามาเลย์ (*R.tiomanicus*) หนูนอรเวย์ (*R.norvegicus*) หนูจี๊ด (*R. exulans*) หนูหริ่งหางยาว (*Mus caroli*) และหนูหริ่งหางสั้น (*R.cervicolor*) นอกจากจะทำลายพืชทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคสำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์และสัตว์เลี้ยง เช่น กาฬโรค โดยมีหมัดที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะของโรค และโรคเลปโตสไปโรซิสหรือไข้ฉี่หนูที่เกิดจากแบคทีเรีย *Leptospira interrogans* เป็นต้น

การป้องกันกำจัดหนูโดยการใช้สารกำจัดหนู (rodenticide) ในปัจจุบัน มีการใช้สารกำจัดหนู 2ประเภทหลัก คือสารกำจัดหนูประเภทออกฤทธิ์เร็ว (acute rodenticide หรือ single dose rodenticide) เป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษสูง ทั้งต่อมนุษย์และสัตว์อื่น และมีข้อเสียคือทำให้หนูเข็ดขยาดต่อเหยื่อพิษ (bait shyness) และสารกำจัดหนูประเภทออกฤทธิ์ช้า (chronic rodenticide หรือ multiple dose rodenticide) แต่ถ้าใช้เป็นระยะเวลานานทำให้หนูสามารถสร้างความต้านทานขึ้นมาได้ ดังนั้น วิธีการป้องกันกำจัดหนูโดยชีววิธี เช่น การใช้เชื้อโปรโตซัวกำจัดหนู จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่อาจช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการใช้สารเคมีดังกล่าวได้

อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่เกี่ยวข้องและควรคำนึงถึงในการใช้ปรสิตชนิดใดๆกำจัดหนู ได้แก่ มีความจำเพาะเจาะจงต่อสัตว์อาศัย สามารถในการลดการสืบพันธุ์หรือขยายพันธุ์ของสัตว์อาศัยได้ และต้องมีระยะติดเชื้อ (infective phase) ที่รุนแรงและสม่ำเสมอ ซึ่งอาจต้องมีการช่วยเหลือจากสัตว์อาศัยตัวกลาง (Anderson and May,1978) ซึ่งใน ปี ค.ศ. 1975 Zaman and Colly ได้ค้นพบ

เชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ในมูลงูเหลือม (*Python reticulatus*) ซึ่งเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้จัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa, Class Sporozoasida, Order Eucoccidiorida, Family Sarcocystidae , Genus Sarcocystis โปรโตซัวชนิดนี้มีการสร้างซีสต์ระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโต โดยต้องการสัตว์อาศัย 2 ชนิด ในการเจริญและขยายพันธุ์ ได้แก่ สัตว์อาศัยตัวกลาง (intermediate host) และสัตว์อาศัยสุดท้าย (definitive host) โปรโตซัวชนิดนี้พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความจำเพาะสูงต่อสัตว์อาศัยระหว่างหนูและงูเหลือม (Haefner and Frank, 1984) โดยมีการขยายพันธุ์เป็นแบบมีเพศภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือม ได้สปอร์โรซีสต์ (sporocysts) เป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโต โดยพบว่าระยะสปอร์โรซีสต์ของเชื้อชนิดนี้สามารถทำให้หนูสกุลหนูท้องขาวป่วยและตายในที่สุด โดยสปอร์โรซีสต์จะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก เข้าสู่สัตว์อาศัยที่เป็นพาหะคือหนู ซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้จะขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญเช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต และเจริญพัฒนาเป็นแบรดิซ้อยต์ (bradyzoites) ฝังในกล้ามเนื้อของหนู (sarcocysts) เพื่อรอให้งูซึ่งเป็นสัตว์อาศัยแบบจำเพาะมากินและเข้าสู่วัฏจักรต่อไป (ภาพที่ 1)

ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูสกุลท้องขาวและสกุลหนูพุกป่วยและตายทั้งหมดในระดับห้องปฏิบัติการ และ 71% - 92% ในแปลงทดลองในฟาร์มไก่ นาข้าว และสวนปาล์มน้ำมัน (ยุวลักษณ์ และคณะ,2539 ; ยุวลักษณ์ และคณะ,2540; ยุวลักษณ์ และคณะ,2542) โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพแวดล้อม โดยโปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ในกบ คางคก จิ้งเหลน ตุ๊กแก จิ้งจก และแม้กระทั่งสกุลหนูหริ่ง (Jaekel *et*. al.,1999)

Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ ในสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ได้มอบเหยื่อแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สำหรับกำจัดหนู ให้แก่กรมวิชาการเกษตร เพื่อนำมาผลิตเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปกำจัดหนู และทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลอง พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการทำให้หนูสกุลท้องขาว และสกุลหนูพุก ป่วยและตาย 100% (ยุวลักษณ์ และคณะ,2544) ทั้งนี้ เหยื่อที่ดีควรมีส่วนผสมที่สามารถล่อหรือดึงดูดให้หนูมากินได้ โดยปกติมักใช้เมล็ดธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ปลายข้าว ข้าวโพด ซึ่งการเลือกเหยื่อมีความสำคัญมาก จะต้องเลือกให้เหมาะสม เหยื่อที่ดีควรมีลักษณะที่หนูชอบกิน ราคาไม่แพง หาได้ง่ายในท้องถิ่น และเก็บได้นานโดยคุณสมบัติ หรือประสิทธิภาพในการกำจัดหนูไม่เปลี่ยนแปลง (Henderson *et*. al., 2002) ซึ่งในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบันได้ปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารบางชนิด โดยใช้วัสดุที่มีในประเทศไทยทดแทนสูตรดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม พบว่าการผลิตเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูป ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น มีขีดความสามารถน้อยในการแข่งขัน

กับอาหารในธรรมชาติของหนู เหยื่อสำเร็จรูปมีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน เนื่องจากรูปแบบของเหยื่อที่ยังไม่เหมาะสมพอที่จะให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน ปัจจัยที่ทำให้โปรโตซัวตาย คือ น้ำมันพืชที่เป็นส่วนผสมหนึ่งของเหยื่อ ปิดกั้นการใช้ออกซิเจนของสปอร์โรซ้อยต์ (sporozoite) ในสปอร์โรซีสต์ มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดหนูลดลง (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2542) (ภาพที่ 2)

ดังนั้น ในการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเดิมที่ยังคงมีข้อจำกัดดังกล่าว เพื่อให้ได้เหยื่อรูปแบบใหม่ที่หนูชอบกิน ราคาถูก มีอายุในการเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 3 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนู และมีศักยภาพในการแข่งขันกับอาหารในธรรมชาติของหนูได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรอาหารและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป ให้เหมาะสมยิ่งขึ้นสำหรับการผลิตเป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูและสามารถถ่ายทอดให้แก่ภาคเอกชนและผู้ที่สนใจได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเหยื่อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม *(Python reticulatus*) หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus* rattus) และหนูทดลองสายพันธุ์วิสตาร์ *(Rattus novegicus*; Wistar rat)
- กรงทดลองประเภทต่างๆ ได้แก่ กรงเลี้ยงงู กรงเลี้ยงหนู กรงดักหนูเป็น กรงทดสอบเดี่ยวพร้อมขวดน้ำ
- เหยื่อแป้งนุ่ม ประกอบด้วย แป้งสาลี เมล็ดข้าวโพดบด น้ำตาลทราย น้ำมันข้าวโพด อาหารหนูชนิดเม็ด และแป้งทัลคัม (talcum powder)
- อาหารหนูสำเร็จรูป วัสดุเกษตรอื่นๆสำหรับเป็นอาหารเสริมให้สัตว์ทดลอง และใช้ดักหนู
- สารเคมี เช่น น้ำตาลกลูโคส gelatin ,nucleic acid , ethyl alcohol, xanthan gum
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ขวดพลาสติกขนาดต่างๆ สำหรับการปั่นตกตะกอนโปรโตซัว เครื่องมือผ่าตัด beaker, petri-dish , blood couting chamber, เป็นต้น
- อุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น เช่น กระดาษทิชชูอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ผ้าปิดจมูก สำลี ฯลฯ

วิธีการ

1. <u>คัดเลือกหนูทดลองและคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูง</u>

1.1 คัดเลือกหนูทดลองโดยดักหนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) จากแหล่งเกษตรกรรม

และจากสถานที่ราชการทั้งเพศผู้และเพศเมีย มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 1 สัปดาห์ และคัดเลือกหนูที่โตเต็มวัย สมบูรณ์ แข็งแรง และมีน้ำหนักตัวระหว่าง 95 -120 กรัม จำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) บันทึกน้ำหนักและเพศของหนู แล้วแยกใส่กรงทดลอง ละ 1 ตัว อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพทำให้หนูป่วยและตาย 100% โดยการให้หนูติดเชื้อ (infected rat) สายพันธุ์วีสตาร์ ที่มีซีสต์ของ *S. singaporensis* ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง แก่งูเหลือม จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพเชื้อโปรโตซัวที่ได้จากมูลงูเหลือมกับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว, เพศเมีย 5 ตัว) ด้วยวิธี bio assay

2. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวและคุณสมบัติทางกายภาพส่วนประกอบของหยื่อ

2.1 หลังจากได้สปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* จากขั้นตอนที่ 1 แล้ว ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อทันที โดยการย้อมด้วยสี nucleic acid ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของเชื้อจากสูตร

$$\% \text{ Death} = \frac{[\text{number of stained sporocyst}]}{[\text{total number - number of ghost}]} \times 100$$

2.2 ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (เช่น การละลาย การแข็งตัว) ของ food additives ชนิดต่างๆ เช่น เจล เจลาติน ผงวุ้นและแซนแทนกัม (Caldic ®) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะที่สุด ที่สามารถทำให้เชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* แขวนลอยและมีชีวิตอยู่ได้นานอย่างน้อย 3 เดือน

3. ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ

3.1 บรรจุสปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจล (รูปแบบใหม่) ลงในเหยื่อแป้งนุ่ม แล้วแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรกนำไปทดสอบการมีชีวิตของเชื้อ โดยการย้อมด้วยสี nucleic acid และกลุ่มที่ 2 นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้หนูป่วยและตาย ด้วยวิธี bio assay กับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) ในห้องปฏิบัติการ

3.2 สังเกตผลและผ่าพิสูจน์หนูทดลองที่ตาย เพื่อตรวจสอบอวัยวะภายใน บันทึกการทดลอง และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

3.1 เตรียมเหยื่อและทดสอบประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับข้อ 1. หลังทิ้งเหยื่อไว้นาน 1 , 2 , 3 4 , 5 และ 6 เดือน พร้อมบันทึกผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2548 **สิ้นสุด** กันยายน 2553 **รวม** 5 ปี (การทดลองยังไม่เสร็จสิ้น)

สถานที่ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู และดักหนูทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม สถานที่ราชการในกรมวิชาการเกษตร รวมถึงเขตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. <u>คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพ</u>

คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้หนูป่วยและตาย ด้วยวิธี bio assay โดยให้เชื้อแก่หนูด้วย feeding tube ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S- 82

2. <u>ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวที่เป็นส่วนประกอบของหยื่อ</u>

เชื้อโปรโตซัวที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจล แล้วทิ้งไว้นาน 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน 4 เดือน และ 5 เดือน เมื่อนำมาทดสอบการมีชีวิต โดยการย้อมด้วยสี nucleic acid ซึ่งสีย้อมที่ชี้วัดการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium และ Syto-9 (Belosevic *et* al., 1997) หลังจากย้อมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าสปอร์โรซีสต์ที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจลยังคงมีชีวิต 100%, 100 % , 99% , 96% และ 60 % ตามลำดับ

3. <u>ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ</u>

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้หนูป่วยและตายด้วยวิธี bio assay กับหนูท้องขาวบ้านในห้องปฏิบัติการ โดยให้เชื้อปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ สังเกตผลและผ่าพิสูจน์หนูท้องขาวบ้านที่ตาย เพื่อตรวจสอบอวัยวะภายใน พบว่าเชื้อในรูปแบบเจลที่เก็บไว้นาน 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน ทำให้หนูตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายในเวลา 17 - 42 วัน ซึ่งหนูที่ตายส่วนใหญ่มีอาการตาแฉะ น้ำหนักลด เมื่อผ่าพิสูจน์อวัยวะภายใน พบว่าเนื้อเยื่อปอดและหัวใจมีเลือดคั่ง บางตัวมีอาการน้ำท่วมปอด ซึ่งอาการดังกล่าว เกิดจากเชื้อเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อปอด และเนื้อเยื่อหัวใจ (วิยะดา และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า หนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้นไป จำนวน 2 ใน 3 มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา (ภาพที่ 3)

จากการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล พบว่าหนูยังชอบกิน และมีอายุในการเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 3 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนูได้ 50-70 % จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรจะพัฒนาต่อไปได้ เนื่องจากเจลมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว โครงสร้างเจลเกิดจากโมเลกุลของสายโพลิเมอร์ จับกันด้วยพันธะชนิดต่างๆ ที่สามารถจับกับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไว้ภายในได้ (McClements, 1999) ซึ่งในธรรมชาติ มีโพลิเมอร์ชีวภาพหลายชนิด ที่มีคุณสมบัติการเกิดเจล เนื่องจากโพลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้ มีขนาดโมเลกุลใหญ่และสามารถละลายน้ำได้ เช่น โพลิเมอร์กลุ่มโพลิแซคคาไรด์ alginate จากเชื้อ *Pseudomonas*, dextran จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และสาร xanthan จากเชื้อ *Xanthomonas compestris* สารแซนแทนกัม (xanthan gum) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ที่แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* สร้างขึ้นบริเวณผนังเซลล์ โดยแบคมีเรียชนิดที่นิยมนำมาผลิตสารแซนแทนได้แก่ *X. campestris* และ *X.phaseoli* (บุษราคัม,2548)

อย่างไรก็ตาม พบว่าเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่เก็บรักษาไว้นานมากกว่า 3 เดือน มีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้น เพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อและควบคุมคุณภาพของเหยื่อรูปแบบเจล จึงต้องมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของหนู การเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงปัจจัยอื่นๆเกี่ยวกับความแข็งแรงของเชื้อ ซึ่ง Rehg (1996) พบว่าสาร dexamethasone สามารถลดระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองต่อเชื้อโปรโตซัว *Cryptosporidium pavum* ได้ และ Schmatz (1997) รายงานว่า manitol มีความสำคัญต่อการมีชีวิตและความแข็งแรงของขบวนการขยายพันธุ์ของโปรโตซัว *Eimeria* ในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตในสัตว์อาศัย โดยพบว่าระยะโอโอซีสต์มี manitol สูงถึง 0.3 โมล (Mol.) ซึ่งได้จาก manitol cycle ในขบวนการเมตาบอลึซึมของการขยายพันธุ์โปรโตซัวแบบมีเพศ ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของโอโอซีสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ เมื่อถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดสอบความชอบต่อเหยื่อรูปแบบใหม่ ของหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าหนูท้องขาวบ้านทั้งสองเพศ ชอบกินเหยื่อแป้งนุ่มรูปแบบใหม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเชื้อที่อยู่ในสาร xanthan gum นาน 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน,4 เดือน และ 5 เดือน ยังคงมีชีวิต 100%, 100 %, 99%, 96% และ 60% ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) จากการผ่าพิสูจน์หนูที่ตาย พบว่าหนูที่ตายส่วนใหญ่ตาแฉะ น้ำหนักลด น้ำท่วมปอด และหนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้น

ไป ประมาณ 70 % มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา

จากการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล พบว่าหนูยังชอบกิน และเหยื่อที่เก็บรักษานาน 3 เดือน ยังคงมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดหนูได้ 50 -70 % ดังนั้นเหยื่อดัดแปลงรูปแบบเจล จากผงแซนแทนกัม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรจะพัฒนาต่อไปได้ เนื่องจากแซนแทนกัมมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว จึงสามารถจับกับน้ำไว้ภายในได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าว จะช่วยให้สปอร์โรซีสต์มีชีวิตนานขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบว่าเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่เก็บรักษาไว้นานกว่า 3 เดือน มีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้น เพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อและควบคุมคุณภาพของเหยื่อรูปแบบเจล จึงต้องมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของหนู การเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงปัจจัยอื่นๆเกี่ยวกับความแข็งแรงของเชื้อ เพื่อให้เหมาะสมยิ่งขึ้นสำหรับการผลิตเป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูในเชิงพาณิชย์ และสามารถถ่ายทอดให้แก่ผู้ที่สนใจได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณบุษราคัม อุดมศักดิ์ นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อนุเคราะห์แซนแทนกัม สำหรับการทดลองในครั้งนี้ และขอขอบคุณ นายทรงทัพ แก้วตา และนายโยฆินทร์ โพธิ์ศรี เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยดักหนู และดูแลหนูทดลอง ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และท้ายที่สุด ขออุทิศผลงานให้แก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่มีส่วนทำให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และธีระเดช เจริญรักษ์. 2539. ทดสอบความชอบในการกินเหยื่อของหนูนอร์เวย์ .รายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 250-251.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ.2548. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างแซนแทนกัม. รายงานผลการวิจัยปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 254.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 255-256.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค และทรงทัพ แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่. รายงายผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง,2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.

วิยะดา สีหะบุตร ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และกรแก้ว เสือสะอาด.2539. การก่อพยาธิสภาพของ *Sarcocystis singaporensis* (Zaman and Colley, 1975) ในหนูพุกใหญ่. รายงานผลการวิจัยปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 238.

เสริมศักดิ์ หงส์นาค พวงทอง บุญทรง เกษมทองทวี ชมพูนุท จรรยาเพศ กรแก้ว เสือสะอาด ทรงทัพ แก้วตา และยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ. 2536. การประเมินความเสียหายของข้าวที่เกิดจากหนูศัตรูข้าวในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2536. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.หน้า 10-18.

Anderson,R.M. and May, R.1978. Regulation and stability of host-parasite population Interaction:

Bartoshuk,L.M., Harned,M.A. and Parks,L.H. 1971. Taste of water in the cats: effects on sucrose preference, Science 171 : pp.699-701.

Beaver, P.C., and Maleckar, J.R. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976.*Sarcocystis villivillosi* sp.p, and *Sarcocystis zamani* sp.n: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. J.I of Parasitology, 67: 241-256.

McClements, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice & Techniques. CRC Press. pp. 275 - 278.

Fayer, R. and Nerad, T. 1996. Effect of low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium Pavum* Oocysts. Appl. And Envi.Microbiol. 62(4) : 1431-1433.

Haefner, U and Frank, W. 1984. Host specificity and host range of the genus Sarcocystis in three snake-rodent life cycles. Zb1.Bak.Hyg., Orig. A 256, 296-299.

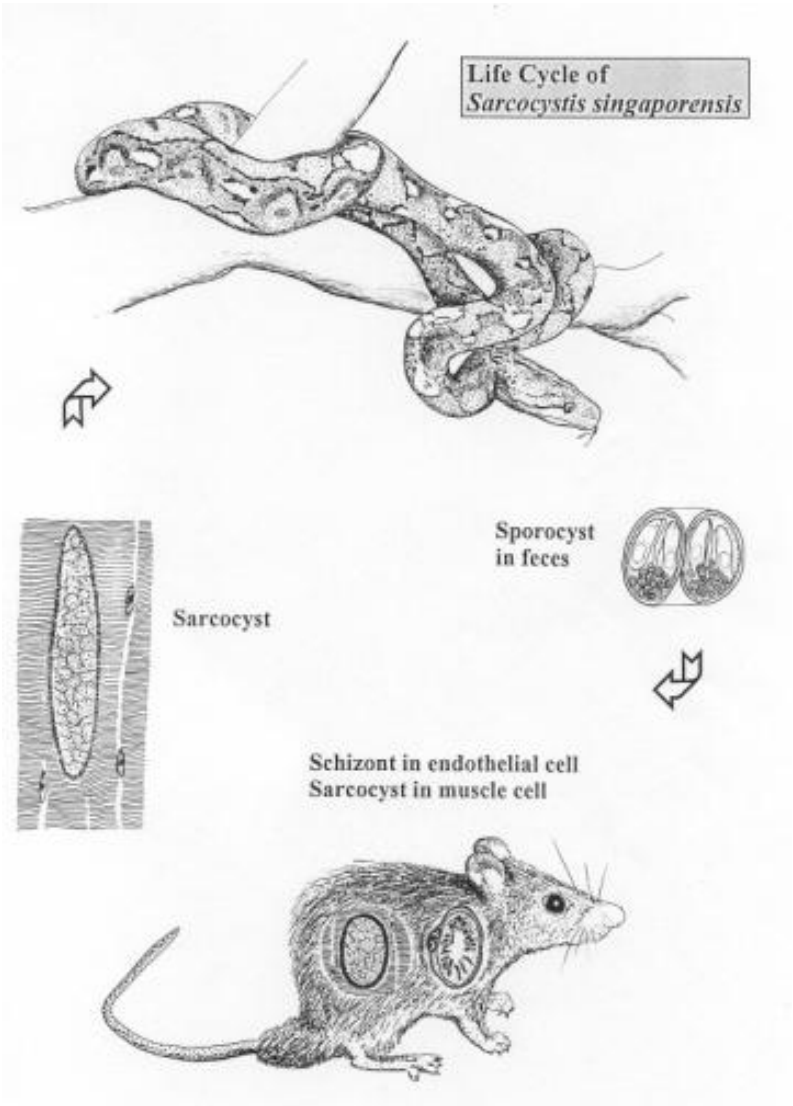
Henderson, R., Ross, J. and Frampton, C. 2002. Development of a long life bait for control of stoats. DOC Sci. Int. Ser. 51 ,Department of conservation. Wellington.: 15 p.

Jaekel, T., Burgstaller, H. and Frank, W. 1996. *Sarcocystis singaporensis* : Studies on host specificity, pathogenicity, and potential use as a biocontrol agent of wild rats. J.Parasitol. 82, 280-287.

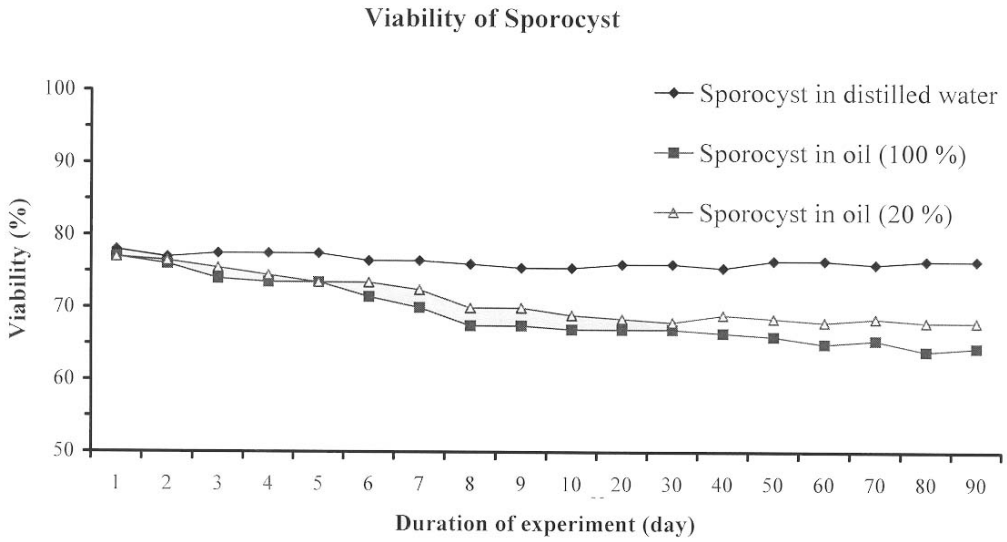
Jaekel,T., Khprasert,Y ., Endepol,S., .Acher-Baumann,C.,Suesa-ard, K., Promkerd,K., Kliemt, D.,Boonsong ,P. and Hongnark,S.1999. Biological Control of rodents using *Sarcocystis singaporensis*. Int., J., Parasitol. 29 : 1321-1330.

Rehg, J.E., 1996. Effect of Di-ethyldithiocarbamate on *Cryptosporidium pavum* infection in Immune - supressed rats. J.Parsitol. 82(1) : 158-162.

Schmatz,D.M. 1997. The Manitol cycle in Eimeria. Parasitology : 114.



ภาพที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีวงจรชีวิตและมีการขยายพันธุ์โดยมีสัตว์อาศัยระหว่างหนู และงูเหลือม
(ที่มา : Jaekel, 1996)



ภาพที่ 2 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลา และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ
(ที่มา : ยุวลักษณ์ และคณะ, 2542 และ Jaekel,1996)

ก **ข**

ภาพที่ 3 : หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) ที่ตายหลังจากกินเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่
ก หนูท้องขาวบ้าน ที่ตายภายหลังได้รับเชื้อ 19 วัน มีอาการตาแฉะ และน้ำหนักลด
ข หนูท้องขาวบ้าน ที่ตายภายหลังได้รับเชื้อ 42 วัน พบซีสต์ปริมาณสูงในกล้ามเนื้อโดยเฉพาะ บริเวณหน้าท้องและกล้ามเนื้อบริเวณโคนขา

ศึกษาระยะเวลา การเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่

ดาราพร รินทะรักษ์ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ กรแก้ว เสือสะอาด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay ก่อนนำมาผลิตเหยื่อรูปแบบใหม่ที่ ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S -82 มาผลิตเหยื่อรูปแบบใหม่โดยเติมสาร แซนแทนกัม (xanthan gum) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทำให้สปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวมีชีวิตนานขึ้น จากการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน, 2 เดือน และ 4 เดือน พบว่าเชื้อยังคงมีชีวิต 100 %, 100 % และ 96 % ตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าเหยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่นาน 6 เดือน โดยเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-02-02-52

คำนำ

ปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็นสารชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนู โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น และถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปแล้ว โดยปรับปรุงจากเหยื่ออาหารแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สูตรดั้งเดิมที่ได้รับจาก Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ ในสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี คุณสมบัติของเหยื่อที่ดีควรมีลักษณะที่หนูชอบกิน ราคาไม่แพง หาได้ง่ายในท้องถิ่น และเก็บได้นานโดยประสิทธิภาพในการกำจัดหนูไม่เปลี่ยนแปลง (Henderson *et*. al., 2002) เหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน เป็นการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารบางชนิด โดยใช้วัสดุที่มีในประเทศไทยทดแทนสูตรดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม เหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่ผลิตในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น มีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน เนื่องจากรูปแบบของเหยื่อยังไม่เหมาะสมพอที่จะให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน ยุวลักษณ์ และคณะ (2542) พบว่าปัจจัยที่ทำให้เชื้อโปรโตซัวตาย คือน้ำมันพืชซึ่งใช้เป็นส่วนผสมของเหยื่อ โดยปิดกั้นการใช้ออกซิเจนของสปอร์โรซ้อยต์ (sporozoite) ที่อยู่ในสปอร์โรซีสต์ เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดหนูลดลง

Beaver and Maleckar (1981) พบว่าในมูลงูเหลือม นอกจากจะพบสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* แล้ว ยังพบสปอร์โรซีสต์ *S. vilivillosi* และ *S. zamani* ซึ่งสปอร์โรซีสต์เหล่านี้สามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ได้ประมาณ 2 ปี โดยยังคงประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูที่ติดเชื้อป่วยและตายได้

Belosevic *et* al. (1997) ใช้สีย้อมในกลุ่ม nucleic acid เพื่อตรวจวัดการมีชีวิตของโอโอซีสต์ของปรสิต *Crytosporidium parvum* ในหลอดทดลอง และสรุปว่าสีย้อมที่ตรวจวัดการมีชีวิตของโอโอซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium and Syto-9

ในปี 2549 ได้ทดสอบความชอบของหนูท้องขาวบ้านในห้องปฏิบัติการ พบว่าอาหารที่หนูท้องขาวบ้านชอบกินมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ ปลาซาร์ดีน ข้าวกล้อง และอาหารหนูชนิดเม็ด คิดเป็น 100.00%, 72.40% และ 70.25% ตามลำดับ ทำการทดลองนำเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจลมาผลิตเหยื่อโปรโตซัว ทิ้งไว้ 1 เดือน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี pathogenecity test กับหนูท้องขาวบ้าน 10 ตัว พบว่าสามารถทำให้หนูป่วยและตาย 100% ในการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเดิมที่ยังคงมีข้อจำกัดดังกล่าว ควรมีการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรอาหารและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป และศึกษาอายุการเก็บรักษาไปพร้อมๆกัน เพื่อให้ได้วิธีการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบที่เหมาะสมที่สุด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเหยื่อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม *(Python reticulatus*) หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus* rattus) และหนูทดลองสายพันธุ์วิสตาร์ *(Rattus novegicus*; Wistar rat)
- กรงทดลองประเภทต่างๆ ได้แก่ กรงเลี้ยงงู กรงเลี้ยงหนู กรงดักหนูเป็น กรงทดสอบเดี่ยว พร้อมขวดน้ำ
- เหยื่อแป้งนุ่ม ประกอบด้วย แป้งสาลี เมล็ดข้าวโพดบด น้ำตาลทราย น้ำมันข้าวโพด อาหารหนูชนิดเม็ด และแป้งทัลคัม (talcum powder)
- อาหารหนูสำเร็จรูป วัสดุเกษตรอื่นๆสำหรับเป็นอาหารเสริมให้สัตว์ทดลอง และใช้ดักหนู
- สารเคมี เช่น น้ำตาลกลูโคส gelatin ,nucleic acid , ethyl alcohol, xanthan gum
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ขวดพลาสติกขนาดต่างๆ สำหรับการปั่นตกตะกอนโปรโตซัว เครื่องมือผ่าตัด beaker, petri-dish , blood couting chamber, เป็นต้น

วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่1</u>. ผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล ที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ภายในเหยื่อแป้งนุ่มดัดแปลง ที่มีส่วนผสมดังนี้

น้ำมันข้าวโพด : แป้งทัลคัม :เมล็ดข้าวโพดบด :น้ำตาลทราย :แป้งสาลี :อาหารหนูชนิดเม็ด

อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10

<u>ขั้นตอนที่2</u> ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ทำการทดลอง ดังนี้

2.1 นำเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล จำนวน 600 ซอง ไปเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี (treatment) กรรมวิธีละ 100 ซอง เป็นเวลานาน 5 เดือน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ -3 ± 1 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ -3 ± 1 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสงแดด)

กรรมวิธีที่ 3 เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสงแดด)

กรรมวิธีที่ 5 เก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 เก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสงแดด)

กรรมวิธีที่ 7 เชื้อโปรโตซัวแขวนลอยในน้ำเกลือ PBS 1% เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส

2.2 หลังทำการทดลองในข้อ 1. เป็นระยะเวลา 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน, 4 เดือน, 5 เดือน และ 6 เดือน สุ่มเลือกเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล ทั้ง 6 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซอง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 7 โดยนำมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี bio assay กับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 10 ตัว/กรรมวิธี (ตามวิธีมาตรฐานของ ASTM) สังเกตและผ่าพิสูจน์หนูทดลอง เพื่อตรวจสอบซีสต์ในกล้ามเนื้อและอวัยวะภายใน บันทึกการทดลอง และถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

2.3 ในแต่ละเดือน ทำการสุ่มเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล ทั้ง 6 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซอง ละลายในน้ำกลั่น เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว ด้วยการย้อมสี nucleic acid ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของเชื้อจากสูตร

$$\% \text{ Death} = \frac{[\text{number of stained sporocyst}]}{[\text{total number - number of ghost}]} \times 100$$

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเพศ น้ำหนักหนูทดลอง ทั้งก่อนและหลังการทดลอง
2. บันทึกวันที่เริ่ม สิ้นสุด และระยะเวลาที่หนูทดลองตาย
3. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 6 กรรมวิธี ตลอดระยะเวลาทดลอง
4. บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของสปอร์โรซีสต์หลังจากย้อมด้วยสี nucleic acid
5. บันทึกชนิดและปริมาณซีสต์ในกล้ามเนื้อหนูทดลอง พร้อมถ่ายภาพ
6. บันทึกข้อมูลอื่นๆ ที่สังเกตได้ ตลอดการทดลอง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2551 **สิ้นสุด** กันยายน 2553 **รวม** 2 ปี (การทดลองยังไม่เสร็จสิ้น)

สถานที่ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู และดักหนูทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม สถานที่ราชการในกรมวิชาการเกษตร รวมถึงเขตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้เหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ที่มีการเติมสาร แซนแทนกัม (xanthan gum)และมีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ / เม็ด โดยการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S -82 โดยแซนแทนกัม (xanthan gum) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทำให้สปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวมีชีวิตนานขึ้น

สามารถจับกับน้ำและสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ นอกจากนี้สารแซนแทนกัม ยังสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิปกติ

การตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน, 2 เดือน และ 4 เดือน พบว่าเชื้อยังคงมีชีวิต 100 %, 100 % และ 96 % ตามลำดับ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าเหยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ นาน 6 เดือน โดยเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายทรงทัพ แก้วตา เจ้าพนักงานการเกษตรชำนาญงาน และนายโยฆินทร์ โพธิ์ศรี เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยดักหนู ดูแลหนูทดลอง เช่น ให้อาหาร เปลี่ยนกรง ทำความสะอาดกรง และชั่งน้ำหนักหนู ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และขออุทิศผลงานให้แก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่มีส่วนทำให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. รายงายผลการวิจัยปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 254.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง,2544. หนูและการป้องกันกำจัด.กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 36 หน้า.

วิยะดา สีหะบุตร ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และกรแก้ว เสือสะอาด.2539. การก่อพยาธิสภาพของ *Sarcocystis singaporensis* (Zaman and Colley, 1975) ในหนูพุกใหญ่. รายงานผลการวิจัยปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 238.

เสริมศักดิ์ หงส์นาค พวงทอง บุญทรง เกษมทองทวี ชมพูนุท จรรยาเพศ กรแก้ว เสือสะอาด ทรงทัพ

แก้วตา และยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ. 2536. การประเมินความเสียหายของข้าวที่เกิดจากหนูศัตรูข้าวในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2536. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.หน้า 10 -18.

Anderson,R.M. and May, R.1978. Regulation and stability of host-parasite population Interaction:

McClements, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice & Techniques. CRC Press. pp. 275 - 278.

Fayer, R. and Nerad, T. 1996. Effect of low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium Pavum* Oocysts. Appl. And Envi.Microbiol. 62(4) : 1431-1433.

Jaekel,T., Khprasert,Y ., Endepol,S., .Acher-Baumann,C.,Suesa-ard, K., Promkerd,K., Kliemt, D.,Boonsong ,P. and Hongnark,S.1999. Biological Control of rodents using *Sarcocystis singaporensis*. Int., J., Parasitol. 29 : 1321-1330.

Rehg, J.E., 1996. Effect of Di-ethyldithiocarbamate on *Cryptosporidium pavum* infection in Immune - supressed rats. J.Parsitol. 82(1) : 158-162.

Schmatz,D.M. 1997.The Manitol cycle in Eimeria. Parasitology : 114.

ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในการป้องกันกำจัดหนู

ดาราพร รินทะรักษ์ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ กรแก้ว เสือสะอาด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ในห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S -82 การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการพัฒนาสูตรและรูปแบบที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ พร้อมกับศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ สำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ในแปลงทดลอง ขณะเดียวกันได้ติดตามข้อมูลระบาดของหนูในพื้นที่เกษตรกรรรมและการสำรวจประชากรหนูด้วยวิธีการต่างๆ และติดต่อแปลงทดลองสำหรับทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัว ในสภาพไร่

คำนำ

ตั้งแต่ปี 2536 – 2545 กรมวิชาการเกษตร องค์การความช่วยเหลือทางด้านวิชาการของสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน (GTZ) และบริษัทไบเออร์ จำกัด ได้ร่วมกันทำการวิจัยโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* และพบว่าปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เป็นชีวินทรีย์กำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูสกุลท้องขาว (*Rattus* sp.) และสกุลหนูพุก (*Bandicota* sp.) ป่วยและตาย 100%ในห้องปฏิบัติการ และตาย 71% - 92% ในแปลงที่ทดลองในฟาร์มไก่ นาข้าว และสวนปาล์มน้ำมัน (ยุวลักษณ์ และคณะ,2539 ; ยุวลักษณ์ และคณะ,2540; ยุวลักษณ์ และคณะ,2542) โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพแวดล้อม นอกจากนี้โปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ในสัตว์ชนิดอื่น หรือแม้กระทั่งหนูในสกุล *Mus* sp. (Jaekel *et*. al.,1999)

ปัจจุบัน มีการนำเชื้อโปรโตซัวชนิดดังกล่าว มาผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป โดยปรับปรุงจากเหยื่ออาหารแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สูตรดั้งเดิมที่ได้รับจาก Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี แต่เหยื่อสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน ยังมีข้อจำกัด คือ มีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน จึงทำการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป และศึกษาอายุ

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-06-03-02-52

การเก็บรักษาไปพร้อมๆกัน ทั้งนี้ นอกจากการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการแล้ว จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลองไปด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนและสามารถนำไปใช้ได้จริง และสามารถถ่ายทอดแก่เกษตรกรหรือผู้ที่สนใจได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเหยื่อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม *(Python reticulatus)* หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) และหนูทดลองสายพันธุ์วิสตาร์ *(Rattus novegicus*; wistar rat)
- กรงทดลองประเภทต่างๆ ได้แก่ กรงเลี้ยงงู กรงเลี้ยงหนู กรงดักหนูเป็น กรงทดสอบเดี่ยว พร้อมขวดน้ำ
- เหยื่อแป้งนุ่ม ประกอบด้วย แป้งสาลี เมล็ดข้าวโพดบด น้ำตาลทราย น้ำมันข้าวโพด อาหารหนูชนิดเม็ด และแป้งทัลคัม (talcum powder)
- อาหารหนูสำเร็จรูป วัสดุเกษตรอื่นๆสำหรับเป็นอาหารเสริมให้สัตว์ทดลอง และใช้ดักหนู
- สารเคมี เช่น น้ำตาลกลูโคส gelatin ,nucleic acid , ethyl alcohol, xanthan gum
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ขวดพลาสติกขนาดต่างๆ สำหรับการปั่นตกตะกอนโปรโตซัว เครื่องมือผ่าตัด beaker, petri-dish , blood couting chamber, เป็นต้น
- อุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น เช่น กระดาษทิชชูอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ผ้าปิดจมูก สำลี ฯลฯ

วิธีการ

<u>ขั้นตอนผลิตเหยื่อโปรโตซัวในรูปแบบเจล</u> (ในห้องปฏิบัติการ)

1. ผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจลที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ภายในเหยื่อแป้งนุ่มดัดแปลง ที่มีส่วนผสมดังนี้
   น้ำมันข้าวโพด :แป้งทัลคัม :เมล็ดข้าวโพดบด :น้ำตาลทราย :แป้งสาลี :อาหารหนูชนิดเม็ด อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10
2. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อในเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบจลด้วยวิธี nucleic acid staining
3. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อที่บรรจุในเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay กับหนูสกุลท้องขาว จำนวน 30 ตัว สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

ขั้นตอนทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อรูปแบบเจล (ในแปลงทดลอง) ทำการทดลอง ดังนี้

1. กำหนดพื้นที่และวัดขนาดแปลงทดลอง จำนวน 4 แปลง วางแผนการทดลองแบบ RCB ดังนี้
   แปลงที่ 1 แปลงเปรียบเทียบ (ไม่มีการวางเหยื่อโปรโตซัว)
   แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ (วางเหยื่อพิษราคูมิน)
   แปลงที่ 3 วางเหยื่อโปรโตซัวแป้งนุ่มรูปแบบเดิม
   แปลงที่ 4 วางเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ (รูปแบบเจล)
2. ประเมินประชากรหนูในแต่ละแปลง โดยใช้เหยื่อล่อ และสังเกตุพร้อมบันทึกปริมาณการกินเหยื่อของหนู ติดต่อกัน 3 คืน ควบคู่กับสำรวจรอยตีนหนู และดักหนู เพื่อนำมาคำนวณหาจำนวนประชากรหนู ในแต่ละแปลงทดลอง
3. เริ่มวางเหยื่อโปรโตซัวตามแผนการทดลอง จำนวน 2 ครั้งๆละ 2 คืนติดต่อกัน โดยแต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน พร้อมสังเกตุและบันทึกปริมาณการกินเหยื่อของหนู
4. หลังการวางเหยื่อโปรโตซัวตามแผนทดลอง 15 วัน ทำการสำรวจประชากรหนูเช่นเดียวกับข้อ 2 และดักหนูในแปลงทดลองทั้งที่มีชีวิต และซากหนูที่เพิ่งตาย มาผ่าพิสูจน์ ในห้องปฏิบัติการ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2551 **สิ้นสุด** กันยายน 2553 **รวม** 2 ปี (การทดลองยังไม่เสร็จสิ้น)

สถานที่ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู และแปลงทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพ

จากการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้หนูป่วยและตาย 100% ด้วยวิธี bio assay ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S- 82

การทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวที่เป็นส่วนประกอบของหยื่อ

การตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน 4 เดือน และ 5 เดือน เมื่อนำมาย้อมด้วยสีซึ่งสามารถตรวจวัดการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium และ Syto-9 (Belosevic *et* al., 1997) หลังจากย้อมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าสปอร์โรซีสต์ที่แขวนลอยอยู่ในเจลแซนแทนกัม มีชีวิต 100%, 100 % , 99% , 96% และ 60 % ตามลำดับ

<u>การทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ</u>

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ในการทำให้หนูป่วยและตายด้วยวิธี bio assay พบว่าเหยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ทำให้หนูทดลองตาย 70 % โดยเหยื่อที่เก็บไว้ 2 เดือน ทำให้หนูตายลดลง 50 % และเหยื่อที่เก็บไว้ 4 เดือน ทำให้หนูตาย 60 % ซึ่งหนูที่ตายส่วนใหญ่มีอาการตาแฉะ น้ำหนักลด เมื่อผ่าพิสูจน์อวัยวะภายในพบว่าเนื้อเยื่อปอดและหัวใจมีเลือดคั่ง บางตัวมีอาการน้ำท่วมปอด ซึ่งอาการดังกล่าว เกิดจากเชื้อเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อปอด และเนื้อเยื่อหัวใจ (วิยะดา และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า หนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้นไป จำนวน 2 ใน 3 มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา

การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการศึกษาผลของอุณหภูมิและทดสอบประสิทธิภาพต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ที่เก็บไว้นาน 6 เดือน ซึ่งเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี ในห้องปฏิบัติการ (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัว ในสภาพไร่

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายทรงทัพ แก้วตา เจ้าพนักงานการเกษตรชำนาญงาน และนายโยฆินทร์ โพธิ์ศรี เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยดักหนู ดูแลหนูทดลอง เช่น ให้อาหาร เปลี่ยนกรง ทำความสะอาดกรง และชั่งน้ำหนักหนู ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และขออุทิศผลงานให้แก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่มีส่วนทำให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 254.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง, 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.

Jaekel,T., Khprasert,Y ., Endepol,S., .Acher-Baumann,C.,Suesa-ard, K., Promkerd,K., Kliemt, D.,Boonsong ,P. and Hongnark,S.1999. Biological Control of rodents using *Sarcocystis singaporensis*. Int., J., Parasitol. 29 : 1321-1330.

คัดเลือกสายพันธุ์บาซิลลัส และทดสอบประสิทธิภาพควบคุมหอยเชอรี่ และ หอยทากบก

Efficacy Test and Bacillus Selection for Controlling Land Snail and Golden Apple Snail

ปราสาททอง พรหมเกิด **ชมพูนุท จรรยาเพศ**
อัจฉรา ตันติโชดก **ดาราพร รินทะรักษ์**

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของบีที; *Bacillus thuringiensis* 11 สายพันธุ์กับหอยเชอรี่และหอยทากบก 6 ชนิดในห้องปฏิบัติการตามแผนการทดลอง CRD 12 กรรมวิธี 3 ซ้ำ หลังทดสอบ 72 ชั่วโมง พบว่า หอยเชอรี่ที่ทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์ 1-6 ที่อัตรา10^{7}เซลล์ต่อ บีคเกอร์ หอยทุกกลุ่มตาย 0 % สายพันธุ์ 7-9 ที่อัตรา 1 กรัมต่อ บีคเกอร์ หอยตาย 66.66 , 100 และ 100 % ตามลำดับ สายพันธุ์ 10-11 ที่อัตรา 1 มล. ต่อบีคเกอร์ หอยตาย 0 และ100 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0% หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง และหอยเจดีย์ที่ทดสอบด้วย บีที สายพันธุ์ 1-6 ที่อัตรา 10^{6} เซลล์ต่อ กล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่อัตรา 0.4 กรัมต่อ กล่อง สายพันธุ์ 10-11 ที่อัตรา 0.1 มล.ต่อกล่อง พบว่า หอยซัคซิเนียที่ทดสอบด้วยบีทีสายพันธุ์ที่1-6ตาย 0% สายพันธุ์ 7-11หอยตาย100%เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 % หอยเลขหนึ่งและหอยเจดีย์ที่ทดสอบ บีที สายพันธุ์ 1-6 หอยทั้งสองชนิดไม่ตาย สายพันธุ์ 7-9 ตาย 100, 100, 100 และ 86.33 , 100, 86.33 % ตามลำดับ สายพันธุ์ 10-11 ตาย 5 , 25 และ0 , 0 % ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 % ส่วนหอยดักดาน หอยสาริกา และหอยทากยักษ์ที่ทดสอบด้วย บีที สายพันธุ์ 1-6 ที่อัตรา 3 x10^{7}เซลล์ ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่อัตรา 0.8 กรัมต่อ กล่อง สายพันธุ์ 10-11 ที่อัตรา 0.5 มล.ต่อกล่อง พบว่า สายพันธุ์ 1-6 หอยทั้ง 3 ชนิด ตาย 0 % สายพันธุ์ 7-9 หอยดักดานตาย 66.67 ,100 และ 0 % ตามลำดับ หอยสาริกาตาย 100, 100 และ 11.0 % ตามลำดับ หอยทากยักษ์ตาย 50 ,100 และ22.33 % ตามลำดับ สายพันธุ์ 10 ตาย 100 ,100และ 75%ตามลำดับ และสายพันธุ์ 11หอยทั้ง 3 ชนิด ตาย 0 % เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0% เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของหอยแต่ละชนิด หลังทดสอบด้วยบีทีโดยทำสไลด์ถาวรที่ย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซินพบว่าหอยที่ตายมีเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะ

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-03-01-51

ตับของหอยเชอรี่ หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ถูกทำลายหลังทดสอบ 48 ชั่วโมงและหอยดักดาน หอยสาริกา หอยทากยักษ์ ที่ 72ชั่วโมง และทดสอบประสิทธิภาพบีที;Bactospeine และ Xenteri กับหอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดานและหอยสาริกาในอ่างซีเมนต์โดยใส่หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ชนิดละ10ตัว/อ่างหอยดักดานและหอยสาลิกาชนิดละ 5ตัว/อ่าง ตามแผนการทดลองRCB 5 กรรมวิธี 4ซ้ำคือใส่

Bactospeine และ Xenteri อัตรา40กรัม/อ่างด้วยการพ่นให้ถูกตัวหอยและผสมอาหารหว่านให้หอยกินเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม หลังทดสอบ4วัน พบว่าบีทีทั้ง 2ชนิดฆ่าหอยซัคซิเนีย 45-75%หอยเลขหนึ่ง 20-35% หอยเจดีย์ ได้ 20 -60%หอยดักดาน 15-50%และหอยสาริกา 20-6โดยวิธีการพ่นบีทีจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการหว่านเหยื่อ

คำนำ

หอยฝาเดียว (gastropods) จะมีแหล่งอาศัยได้ทั้งในน้ำและบนบกและบางชนิดอาศัยอยู่บนต้นไม้ หอยจึงกินอาหารได้หลากหลายทั้งพืชน้ำ พืชผัก ผลไม้ ซากพืช ซากสัตว์ เห็ดชนิดต่างๆ เป็นต้นจึงมีหอยหลายชนิดที่เป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจ ที่เป็นพืชน้ำได้แก่ หอยเชอรี่กัดกินข้าว บัว ผักบุ้ง ผักกระเฉด และกระจับ เป็นต้น โดยเฉพาะข้าว หอยกัดกินข้าวในระยะกล้า อายุ 10-20 วัน (ชมพูนุทและคณะ 2532) กินเก่งสามารถกินได้ถึง 50% ของน้ำหนักตัว (Gurrero, 1989) สามารถเพิ่มประชากรได้รวดเร็ว เนื่องจากหอยเจริญเติบโตและวางไข่ครั้งละจำนวนมากอาจมากถึง 3,000 ฟองต่อกลุ่มไข่และไข่ฟักเป็นลูกหอยได้มากกว่า 90 % (ชมพูนุทและคณะ 2534) จึงมีการแพร่ระบาดและทำความเสียหายอย่างมาก เกษตรกรจึงทำการป้องกันกำจัดด้วยสารเคมี ชมพูนุทและคณะ (2542) ได้ทดสอบและแนะนำสารเคมีกำจัดหอยคือ นิโคลซาไมด์และเมทัลดีไฮด์ สามารถนำมาฆ่าหอยได้ดี นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้สารสกัดจากพืชหลายชนิดมากำจัดหอย เช่น สะเดา หางไหล มะคำดีควาย มะไฟนกคุ่ม เทียนหยด ลำโพงเป็นต้น ปราสาททอง และคณะ (2545) ได้พบว่าสารสกัดมะคำดีควายสามารถนำมากำจัดหอยเชอรี่ และหอยทากบกได้โดยสารซาโปนินในสารสกัดมะคำดีควายมีผลทำให้เซลล์ในอวัยวะต่างๆ ของหอยถูกทำลายส่งผลให้หอยเหล่านั้นตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีหอยทากบกหลายชนิดที่เป็นศัตรูพืชทั้ง พืชผัก ไม้ผลและไม้ดอกได้แก่หอยอำพัน หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ และ หอยทากยักษ์เป็นต้น จะกัดกินทั้ง ราก ลำต้น ใบ ดอกและผลของพืช โดยเฉพาะต้นกล้าพืชเกือบทุกชนิดจะถูกกัดกินได้รับความเสียหาย อาจต้องทำการปลูกใหม่ หลังจากทำการกำจัดหอยเหล่านั้นแล้ว (Jahan and Raut, 1994) ส่วนไม้ผลจะกัดกินส่วนต่าง ๆของพืช (Srivastava , 1992) เช่น กล้วย จะกัดกินตั้งแต่ระยะผลอ่อนทำให้เกิดแผลและมีผิวสีน้ำตาลบางครั้งอาจเน่าเสียและถูกแบคทีเรียเข้าทำลาย (Dawkins et.al. 1985) เนื่องจากหอยทากบกหากินในเวลากลางคืนหรือหลังฝนตกใหม่ๆ จึงยากที่

จะทำการพ่นสารป้องกันกำจัดหอย จึงนิยมใช้เหยื่อพิษกำจัดหอย ได้แก่ เมทัลดีไฮด์ วางเป็นจุดๆ ห่างกันประมาณ 2 เมตรตามแหล่งที่หอยอาศัยอยู่ (Davidson et.al.,1993) การทำความสะอาดแปลงด้วยการกำจัดวัชพืชจะทำให้ประชากรหอยลดลงได้ การป้องกันกำจัดด้วยชีววิธี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งได้แก่การใช้เป็ด ไก่ กินหอยตามพื้นดินในโรงเรือนปลูกพืช การใช้ใส้เดือนฝอย *Phasmarhabditis hermaphrodita*กำจัดหอยทดแทนสารเคมีได้ (Ester and Geleen, 1996) และยังมีการศึกษาใช้แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว มาควบคุมประชากรหอย (Rueda,1989a)แบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ *Aeromonas hydrophilia* กำจัดหอยทากยักษ์(Mead, 1979a)เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ชอบอยู่ในที่ชื้นซึ่งเป็นบริเวณเดียว กับหอยอาศัยอยู่ และเมื่อพ่นลงดินหรือตามแหล่งอาศัยของหอย ก็จะยังคงอาศัยอยู่บริเวณนั้น เมื่อหอยเดินมากินหรือสัมผัสจุลินทรีย์ก็จะติดโรคและตายในที่สุดจึงเป็นการควบคุมโดยสภาพธรรมชาติและยั่งยืน ดังนั้นจึงทำการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียโดยเฉพาะ บีที มาควบคุมหอยทากบก ซึ่ง บีที เหล่านี้จะเฉพาะเจาะจงกับหอยและไม่เป็นอันตรายกับสัตว์อื่น บีทีหลายสายพันธุ์ได้นำมาใช้กำจัดแมลงได้ผลดีและถูกนำมาใช้เป็นการค้า ในตลาดสารกำจัดแมลงทางการเกษตรนานกว่า 30 ปี (อนุเทพ, 2542)โดยบีทีจะสร้างสารพิษขึ้นภายในเซลล์ สารพิษนี้เมื่อแมลงกินเข้าไปอยู่ในรูปของ protoxin (ยังไม่เป็นพิษ) เมื่อเข้าไปอยู่ในกระเพาะอาหาร น้ำย่อยที่เป็นด่างสูงจำพวก proteolytic enzyme จะย่อย protoxin ให้เป็น active toxin สารพิษนี้จะไปที่ผนังเซลล์ของกระเพาะอาหาร และทำลายผนังเซลล์ให้เป็นแผล ส่งผลให้แมลงตายในที่สุด (อัจฉรา,2544) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ บีที มาทดสอบประสิทธิภาพกับหอยเชอรี่และหอยทากบก ในห้องปฏิบัติการและในสภาพไร่ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

- บีที (*Bacillus thuringiensis*) 11สายพันธุ์ ได้แก่

สายพันธุ์ 1 แยกจากดินที่เก็บจาก อ. แม่สอด จ. ตาก

สายพันธุ์ 2 และ 3 แยกจากดินที่เก็บจาก อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

สายพันธุ์ 4และ 6 แยกจากดินที่เก็บจาก อ. แม่อาย จ. เชียงใหม่

สายพันธุ์ 5 สายพันธุ์ แยกจากดินที่เก็บจาก อ. ฝาง จ. เชียงใหม่

สายพันธุ์ 7 Bactospeine,HPWP,*Bacillus thuringiensis var kurstaki* (serotype303 b)

สายพันธุ์ 8 Xenteri , *Bacillus thuringiensis var aizawai* 35,000 DBMU/ mg

สายพันธุ์ 9 Dipel , wp. 3.2 % *Bacillus thuringiensis var kurstaki* 16,000 IU/ mg

สายพันธุ์ 10 Florbac , F.C. , *Bacillus thuringiensis var aizawai*(serotype 7)

สายพันธุ์ 11 Novodor F.C. , *Bacillus thuringiensis sub. tenebrionis*

2. สัตว์ทดลอง

- หอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* Lamark
- หอยทากบก 6 ชนิดได้แก่ หอยซัคซิเนีย (*Succinea sp.*) หอยเลขหนึ่ง (*Ovachamys fulgens*) หอยทาก ยักษ์ (*Achatina fulica*) หอยดักดาน (*Cryptozona siamensis*) หอยเจดีย์ (*Prosopeas walkeri*) และ หอยสาริกา (*Sarika sp.*)

3.เครื่องมือ

- กล่องพลาสติกขนาด 75 และ 300 ตารางเซนติเมตร
- อ่างซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1เมตรที่บรรจุดินครึ่งอ่าง
- กล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- อาหารเลี้ยงหอย
- เครื่องมือทางเนื้อเยื่อวิทยา

4. สารเคมี

- สีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน
- แอลกอฮอลล์ 70, 95 และ 100 %
- ฟอร์มาลิน 10 % พาราฟิน ไซลีน
- 10 % เอสิค แอลกอฮอลล์

วิธีการ

1. ทดสอบประสิทธิภาพ บีที ในห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของหอยเชอรี่ และหอยทากบกทั้ง 6 ชนิด
3. ทดสอบประสิทธิภาพบีที;Bactospeine และ Xenteri กับหอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดาน และหอยสาริกาในอ่างซีเมนต์

1.เตรียมจุลินทรีย์

- บีที ทั้ง 11 สายพันธุ์ได้จากกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา โดย สายพันธุ์ 1-6 เตรียมจาก บีที ที่แยกจากดินที่เก็บมาจาก จ.ตาก และ จ. เชียงใหม่ ซึ่งเก็บไว้ในอาหารแข็งในหลอดทดสอบ (slant solid media) ทำการเพิ่มปริมาณ บีที ด้วยการเขี่ยจุลินทรีย์ บีที จากอาหารแข็งลงในอาหารเหลวโดยวิธีปราศจากเชื้ออื่นปนเปื้อนแล้วทำให้อยู่ในรูปความเข้มข้น ที่มีจำนวนบีที 10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ 7-9 และ สายพันธุ์ 10-11 เป็นบีทีที่เป็นการค้าที่อยู่ในรูปผงและของเหลวข้นตามลำดับ

2. เตรียมสัตว์ทดลอง

2.1 หอยเชอรี่ เก็บรวบรวมจากแปลงนาของเกษตรกร จ. สุพรรณบุรี มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ในโรงเรือนของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรให้อาหารปลาชนิดเม็ดและพืชน้ำ เช่น สาหร่าย จอกแหน เป็นต้นเป็นอาหาร

2.2 หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง และหอยเจดีย์ เก็บรวบรวมจากแปลงสวนกล้วยไม้ จ. กาญจนบุรี และ จ. สมุทรสาคร มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 300 ตารางเซนติเมตรเพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดลองต่อไป

2.3 หอยทากยักษ์ หอยดักดาน หอยสาริกา เก็บรวบรวมจากแปลงสวนผลไม้ จ. จันทรบุรี และ จ. ลพบุรี มาเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด 300 ตารางเซนติเมตร เพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดลองต่อไป

3. ปี2549 การทดสอบประสิทธิภาพ บีที ในห้องปฏิบัติการ

3.1 หอยเชอรี่ คัดเลือกหอยที่ตัวเต็มวัยและสมบูรณ์ แข็งแรง มีขนาดความสูงเฉลี่ย 43.45 มม.มาใส่บิคเกอร์ขนาด 1,000มล. ที่บรรจุน้ำไว้ 500 มล. บิคเกอร์ละ 3 ตัว เมื่อหอยเปิดฝาคลานดีแล้วใส่ บีทีสายพันธุ์ 1-6 จำนวน 10^{7} เซลล์ต่อบิคเกอร์ สายพันธุ์ 7-9 ใส่ในอัตรา 1 กรัมต่อบิคเกอร์ และ สายพันธุ์ 10-11 ใส่ในอัตรา 1 มล.ต่อบิคเกอร์เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่เป็นน้ำ ตามแผนการทดลอง12 กรรมวิธี 3 ซ้ำ หลังทดสอบ 24,48,และ 72 ชั่วโมงตรวจนับหอยตาย

3.2 หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง และหอยเจดีย์ คัดเลือกหอยที่สมบูรณ์ แข็งแรง มีขนาดความสูงเฉลี่ย 9.79, 4.71และ 9.47 มม.ตามลำดับมาใส่กล่องพลาสติกขนาด 75 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ตัวต่อกล่อง ที่พื้นกล่องแต่ละกล่องบุด้วยกระดาษทีชชูที่พ่นน้ำพอชื้น เมื่อหอยคลานดีแล้วใส่บีที สายพันธุ์ 1-6 จำนวน 10^{6} เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ใส่ในอัตรา 0.4 กรัมต่อกล่อง และสายพันธุ์ 10-11 ใส่ในอัตรา 0.1 มล.ต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นน้ำ โดยทำการทดสอบกับหอยแต่ละชนิดตามอัตราที่กำหนด ตามแผนการทดลอง 12 กรรมวิธี 3 ซ้ำ หลังทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจนับหอยตาย

3.3. หอยดักดาน หอยสาริกา และหอยทากยักษ์ คัดเลือกหอยที่สมบูรณ์ แข็งแรง มีขนาดความกว้างเฉลี่ย 28.5,18.66มม.ตามลำดับและหอยทากยักษ์มีความสูงเฉลี่ย 76.53 มม. มาใส่กล่องพลาสติกขนาด 300 ตารางเซนติเมตร จำนวน 3 ตัวต่อกล่อง ที่พื้นกล่องแต่ละกล่องบุด้วยกระดาษทีชชูที่ พ่นน้ำพอชื้น เมื่อหอยคลานดีแล้วใส่ บีทีสายพันธุ์ 1-6 จำนวน 3 x10^{7} เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9ใส่ในอัตรา 0.8 กรัมต่อกล่อง และสายพันธุ์ 10-11 ใส่ในอัตรา 0.5 มล.ต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่พ่นน้ำ โดยทำการทดสอบกับหอยแต่ละชนิดตามอัตราที่กำหนดตามแผนการทดลอง 12 กรรมวิธี 3 ซ้ำ หลังทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจนับหอยตาย

4. **ปี2550 ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา** ด้วยการสุ่มเก็บหอยแต่ละชนิดที่มีชีวิตอยู่หลังทดสอบด้วยบีทีนาน48ชั่วโมงของแต่ละกรรมวิธีๆละ1ตัวมาทุบเอาเปลือกออกทำให้คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน10 %นาน24ชั่วโมงล้างชิ้นเนื้อหอยด้วยน้ำประปาที่ไหลนาน1-2ชั่วโมงเก็บรักษาชิ้นเนื้อเยื่อในเอธานอล70%หรือนำมาทำพาราฟินบล็อกเนื้อเยื่อ(embedding)ตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้ขนาดชิ้นเนื้อหนา 6ไมโครเมตร นำแผ่นชิ้นเนื้อที่ตัดได้ติดบนแผ่นสไลด์แก้ว ทำการย้อมสี ฮีมาท็อกไซลิน และ สี อีโอซิน ปิดด้วย cover glass และอุ่นบนเครื่องอุ่นสไลด์จนแห้งดีแล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. **ปี 2551-2552 ทดสอบประสิทธิภาพบีที;Bactospeine และXenteri** กับหอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดาน และหอยสาริกาในอ่างซีเมนต์แล้วใส่หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ ชนิดละ10ตัว/อ่างหอยดักดาน และหอยสาริกา ชนิดละ 5 ตัว/อ่าง ตามแผนการทดลอง RCB 5กรรม วิธี 4 ซ้ำคือใส่ Bactospeine และ Xenteri อัตรา 40กรัม/อ่างด้วยการพ่นให้ถูกตัวหอยและผสมอาหารหว่านให้หอยกิน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ให้น้ำและอาหารหอยปกติ

บันทึกข้อมูล

6.1 อัตราการตายของหอยเชอรี่ หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ที่ 24, 48 ,72 ชม. และ 4 วัน ส่วนหอยดักดาน หอยสาริกา หอยทากยักษ์ ที่ 2 ,3 และ 4 วัน

6.2 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหอยชนิดต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่ม ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2552

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี 2549 จากการทดสอบประสิทธิภาพบีที 11 สายพันธุ์ กับหอยเชอรี่ และหอยทากบก 6 ชนิด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่พ่นน้ำพบว่า

1.หอยเชอรี่

หอยเชอรี่ ที่ 24 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีที สายพันธุ์ 1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{7} เซลล์ ต่อบิคเกอร์ หอยทุกกลุ่มตาย 0 % สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อบิคเกอร์ หอยตาย 0, 77.77± 0.5 และ 0 %ตามลำดับ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 1.0 มล. ต่อบิคเกอร์หอยตาย 0 และ0% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยเชอรี่ ที่ 48 ชั่วโมง หลังทดสอบ ด้วย บีที สายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{7} เซลล์ต่อบิคเกอร์หอยทุกกลุ่มตาย 0 % สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อบิคเกอร์หอยตาย 33.33 ± 0.57, 100และ 100%ตามลำดับ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 1.0 มล. ต่อบิคเกอร์หอยตาย 0 และ 100 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยเชอรี่ ที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบ ด้วย บีที สายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{7} เซลล์ต่อบิคเกอร์หอยทุกกลุ่มตาย 0 % สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อบิคเกอร์หอยตาย 66.66 ± 1.41, 100และ 100%ตามลำดับ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 1.0 มล. ต่อบิคเกอร์หอยตาย 0 และ 100 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

2. หอยซัคซิเนีย

หอยซัคซิเนีย ที่ 24 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีที สายพันธุ์1- 6 ที่ความเข้มข้น 10^{6} เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องและ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยซัคซิเนีย ที่ 48 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีที สายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{6} เซลล์ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่อง.หอยตาย 55.0± 2.67, 80.0± 1.15 และ65.0± 2.36 % ตามลำดับ สายพันธุ์ 10-11ที่เข้มข้น 0.1 มล.ต่อกล่องหอยตาย 60.0 ±2.30 และ 55.0± 2.21 % ตามลำดับเปรียบเทียบ กับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยซัคซิเนีย ที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีที สายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{6} เซลล์ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0 % สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องและ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1มล.ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย100 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

3. หอยเลขหนึ่ง

หอยเลขหนึ่ง ที่ 24 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{6} เซลล์ ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องและ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยเลขหนึ่ง ที่ 48 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{6} เซลล์ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องหอยตาย 100,100และ 100% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่องหอยตาย 5 ± 0.5และ 25 ± 1.89 % ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยเลขหนึ่ง ที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10^{6} เซลล์ ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องหอยตาย 100,100และ 100% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่องหอยตาย 5 ± 0.5และ 25 ± 1.89 % ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

4. หอยเจดีย์

หอยเจดีย์ ที่ 24 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10 ^{6}เซลล์ ต่อกล่องสายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่อง และ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยเจดีย์ ที่ 48 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10 ^{6} เซลล์ ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องหอยตาย 73.33± 0.57, 100และ60.0 ±1.0% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่องหอยตาย0และ 0 % ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยเจดีย์ ที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 10 ^{6} เซลล์ ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อกล่องหอยตาย 86.33± 1.15, 100 และ 86.33 ±1.15% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.1 มล. ต่อกล่อง หอยตาย 0 และ 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

5. หอยดักดาน

หอยดักดาน ที่ 2วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7}เซลล์ ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่อง และ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยดักดาน ที่ 3 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7} เซลล์ ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่อง และ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยดักดาน ที่ 4 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7} เซลล์ ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่องหอยตาย 66.67 ± 1.15, 100และ0% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยตาย100และ 0 % ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

6. หอยสาริกา

หอยสาริกา ที่ 2 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7} เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่อง และ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยสาริกา ที่ 3 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7} เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่องและ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยสาริกา ที่ 4 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7} เซลล์ต่อกล่อง หอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่องหอยตาย 100, 100และ 11.0 ± 1.41% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยตาย100และ 0 % ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

7. หอยทากยักษ์

หอยทากยักษ์ ที่ 2 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7}เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่องและ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยทากยักษ์ ที่ 3 วัน หลังทดสอบด้วย บีทีสายพันธุ์1-6 ที่ความเข้มข้น 3 x10 ^{7}เซลล์ต่อกล่อง สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่องและ สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

หอยทากยักษ์ที่ 4วัน หลังทดสอบด้วยบีทีสายพันธุ์1-6ที่ความเข้มข้น3 x10 ^{7}เซลล์ต่อกล่องหอยทุกกลุ่มตาย 0% สายพันธุ์ 7-9 ที่ความเข้มข้น 0.8 กรัมต่อกล่องหอยตาย 50± 2.12,100 และ 22.33± 0.7% ตามลำดับ. สายพันธุ์ 10-11 ที่เข้มข้น 0.5 มล. ต่อกล่องหอยตาย75.0±0.57และ 0 %ตามลำดับเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตาย 0 %

ปี 2550 ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของหอยทั้ง 7 ชนิดที่ทดสอบด้วยบีที 11 สายพันธุ์ดังนี้

1.หอยเชอรี่ที่ทดสอบด้วยบีที ที่มีประสิทธิภาพฆ่าหอย พบว่าเซลล์ผลิตน้ำย่อยและเนื้อเยื่อใน

อวัยวะตับถูกทำลาย ส่วนสายพันธุ์บีที ที่ไม่มีประสิทธิภาพฆ่าหอย พบเซลล์ผลิตน้ำย่อยเป็นปกติเหมือนกับกลุ่มควบคุม คือเซลล์ผลิตน้ำย่อยมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกเรียงตัวเป็นเยื่อบุผิวของท่อผลิตน้ำย่อยมีนิวเคลียสกลมติดสีม่วงแดงอยู่ที่ฐานเซลล์ส่วนไซโตพลาสซึ่มติดสีชมพู และพบเซลล์สะสมสารซึ่งภายในเซลล์ติดสีดำเกือบเต็มเซลล์เรียงอยู่ปะปนระหว่างเซลล์ผลิตน้ำย่อย ตรงกลางท่อผลิตน้ำย่อยมีช่องว่างเรียกว่า lumen (ภาพที่ 1)

2.หอยทากบกทั้ง 6 ชนิดคือ หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดาน หอยสาลิกา และ

หอยทากยักษ์ ที่ทดสอบด้วยบีที ที่มีประสิทธิภาพฆ่าหอย พบว่า เซลล์ผลิตน้ำย่อยและเนื้อเยื่อในอวัยวะตับถูกทำลาย ส่วนสายพันธุ์บีที ที่ไม่มีประสิทธิภาพฆ่าหอย พบเซลล์ผลิตน้ำย่อยเป็นปกติเหมือนกับกลุ่มคาบคุมคือเซลล์ผลิตน้ำย่อยมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกเรียงตัวเป็นเยื่อบุผิวของท่อผลิตน้ำย่อยมีนิวเคลียสกลมติคสีม่วงแดงอยู่ที่ฐานเซลล์ส่วนไซโตพลาสซึ่มติดสีชมพู และพบ

เซลล์สะสมสารซึ่งภายในเซลล์ติดสีดำเกือบเต็มเซลล์เรียงอยู่ปะปนระหว่างเซลล์ผลิตน้ำย่อย ตรงกลางท่อผลิตน้ำย่อยมีช่องว่างเรียกว่า lumen (ภาพที่ 1)

ปี 2551-2552 ผลการทดสอบประสิทธิภาพ บีที; Bactospeine และ Xenteri กับ หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่งหอยเจดีย์ หอยดักดาน และหอยสาริกา ในอ่างซีเมนต์ พบว่า

1.หอยซัคซิเนีย ที่ทดสอบด้วย Bactospeine และ Xenteri ด้วยการพ่นและผสมอาหารหว่าน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมพบว่าที่ 4วัน หอยตาย 60.0, 45.0, 75.0 , 65.0 และ 0% ตามลำดับ

2.หอยเลขหนึ่ง ที่ทดสอบด้วย Bactospeine และ Xenteri ด้วยการพ่นและผสมอาหารหว่าน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมพบว่าที่ 4วัน หอยตาย 20.0, 35.0, 20.0 ,30.0 และ 0% ตามลำดับ

3. หอยเจดีย์ ที่ทดสอบด้วย Bactospeine และ Xenteri ด้วยการพ่นและผสมอาหารหว่าน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมพบว่าที่ 4วัน หอยตาย 40.0, 30.0, 60.0 , 20.0 และ 0% ตามลำดับ

4. หอยดักดาน ที่ทดสอบด้วย Bactospeine และ Xenteri ด้วยการพ่นและผสมอาหารหว่าน เปรียบเทียบ กับกรรมวิธีควบคุมพบว่าที่ 4วัน หอยตาย 35.0, 50.0, 15.0, 20.0 และ 0% ตามลำดับ

5. หอยสาริกาที่ทดสอบด้วย Bactospeine และXenteri ด้วยการพ่นและผสมอาหารหว่าน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมพบว่าที่ 4วัน หอยตาย 55.0, 65.0, 20.0, 25.0 และ 0% ตามลำดับ

การที่หอยเซอรี่ หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดาน หอยสาริกาและหอยทากยักษ์หลังทดสอบด้วย บีที 11 สายพันธุ์ตามความเข้มข้นที่กำหนดตามแผนการทดลองพบว่า บีที ที่เป็นการค้าคือ บีทีสายพันธุ์ 7-11 มีประสิทธิภาพฆ่าหอยได้เกือบทุกชนิด จึงสามารถนำไปศึกษาประยุกต์ใช้ต่อไปได้ โดยสารพิษที่ผลิตขึ้นมาจะไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะตับของหอยส่งผลให้หอยตายดังภาพที่1 สอดคล้องกับรายงานของอัจฉรา (2544) ส่วนสายพันธุ์ที่ 1-6 ไม่สามารถฆ่าหอยทั้ง 7ชนิดได้อาจเป็นเพราะบีทีเหล่านั้นไม่มีความเฉพาะเจาะจงกับหอยและสารพิษที่ผลิตขึ้นมาจึงไม่ทำลายเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะตับของหอยเหล่านั้นดังภาพที่ 1 หอยจึงไม่ตาย เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพบีที ;Bactospeine และ Xenteri กับหอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดาน และ หอยสาริกา ในอ่างซีเมนต์ ด้วยการพ่นให้ถูกตัวหอยและผสมอาหารหว่านพบว่าการพ่นฆ่าหอยได้มากกว่า อาจเป็นเพราะว่าบีทีที่ผสมอาหารหว่านจะมีเชื้อราขึ้นหลังจากหว่าน 2-3วัน หอยจึงไม่กินเหยื่ออาหาร จึงทำให้หอยตายน้อย

สรุปผลการทดลองและเสนอแนะ

จากผลการทดลองพบว่า บีที สายพันธุ์ 7-9 สามารถฆ่าหอยทั้ง 7 ชนิดได้โดยสายพันธุ์ที่ 8 มีประสิทธิภาพดีสูงสุดสามารถฆ่าหอยทั้ง 7 ชนิดที่นำมาทดสอบได้ถึง 100% โดยสารพิษที่บีทีผลิตขึ้นมาจะไปทำให้เซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะตับของหอยถูกทำลายและเมื่อทดสอบประสิทธิภาพบีที;Bactospeine และ Xenteri กับหอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยดักดาน และหอยสาริกา ในอ่างซีเมนต์ซึ่งเป็นสภาพกึ่งแปลงทดลอง พบว่าหอยตาย 15 -75% ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไปเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในแปลงทดลองที่เป็นสภาพสวนต่อไป

การทดลองด้วยการใช้บีที กับหอยเชอรี่และหอยทากบกนี้เป็นการทดลองที่ยังไม่มีใครเคยทำมาก่อน จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับบีทีบางสายพันธุ์ที่สามารถฆ่าหอยทากบกบางชนิดได้ และเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้บีทีกำจัดหอยศัตรูพืช ซึ่งจะต้องมีการศึกษา ทดลองและพัฒนาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ ทักษิณ อาชวาคมและทรงทัพ แก้วตา.2532. ทดสอบอัตราการกินต้นข้าวของหอยเชอรี่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 115-125.

ชมพูนุท จรรยาเพศ ทักษิณ อาชวาคมและทรงทัพ แก้วตา.2534. ชีววิทยาของหอยเชอรี่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 94-102

ชมพูนุท จรรยาเพศ ทักษิณ อาชวาคมและทรงทัพ แก้วตา. 2542. หอยเชอรี่. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา หอยเชอรี่ โรงแรมโซฟิเทลราชาออคิด ขอนแก่น 15 หน้า.

ปราสาททอง พรหมเกิด ชมพูนุท จรรยาเพศ เรวดี พรหมเกิด.2546. ประสิทธิภาพของสารสกัดปะคำดีควายต่อเซลล์และอัตราการตายของหอยเชอรี่. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 393-401.

อนุเทพ ฟองสมุทร 2542. บีที: การตลาดและการใช้ในประเทศไทย หน้า 41-43 ในการประชุมวิชาการ สารชีวินทรีย์กำจัดศัตรูพืชในศตวรรษที่ 21 วันที่ 15-16 กรกฎาคม 2542 ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์คอนเวนชั่น หลักสี่ กรุงเทพมหานคร

อัจฉรา ตันติโชดก 2544. บีที : การควบคุมแมลงศัตรูพืช หน้า 183-208 ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร

Dawkins,G.,G.Sislop,m.Luxton and C. Bishop. 1985. Transmission of Liquorice rot of carrotsby slugs. J.mollusc. stu. 51, 1985.

Davidson, R.,G.Sondrson and M.Schache.1993. snail control studies in vines. Australian Dried Fruits news 20(3.12-14.)

Ester, A. and P.M. t. M.Geleen. 1996. Integrated control of slugs in sugar beet growing in a rye cover crop, pp. 445-450. In R.F. Henderson (ed.) slug and snail pests in agriculture. Monograph no. 66.british crop protection council, farnham.

Guerrero, L. 1989. The Biology of golden snail in relation to Philippines. Condition (EN.)Workshop on environment impact of the Golden snail on rice Farming system in the Philippines, Munoz, nuevr Ecij Philippines. 5 p.

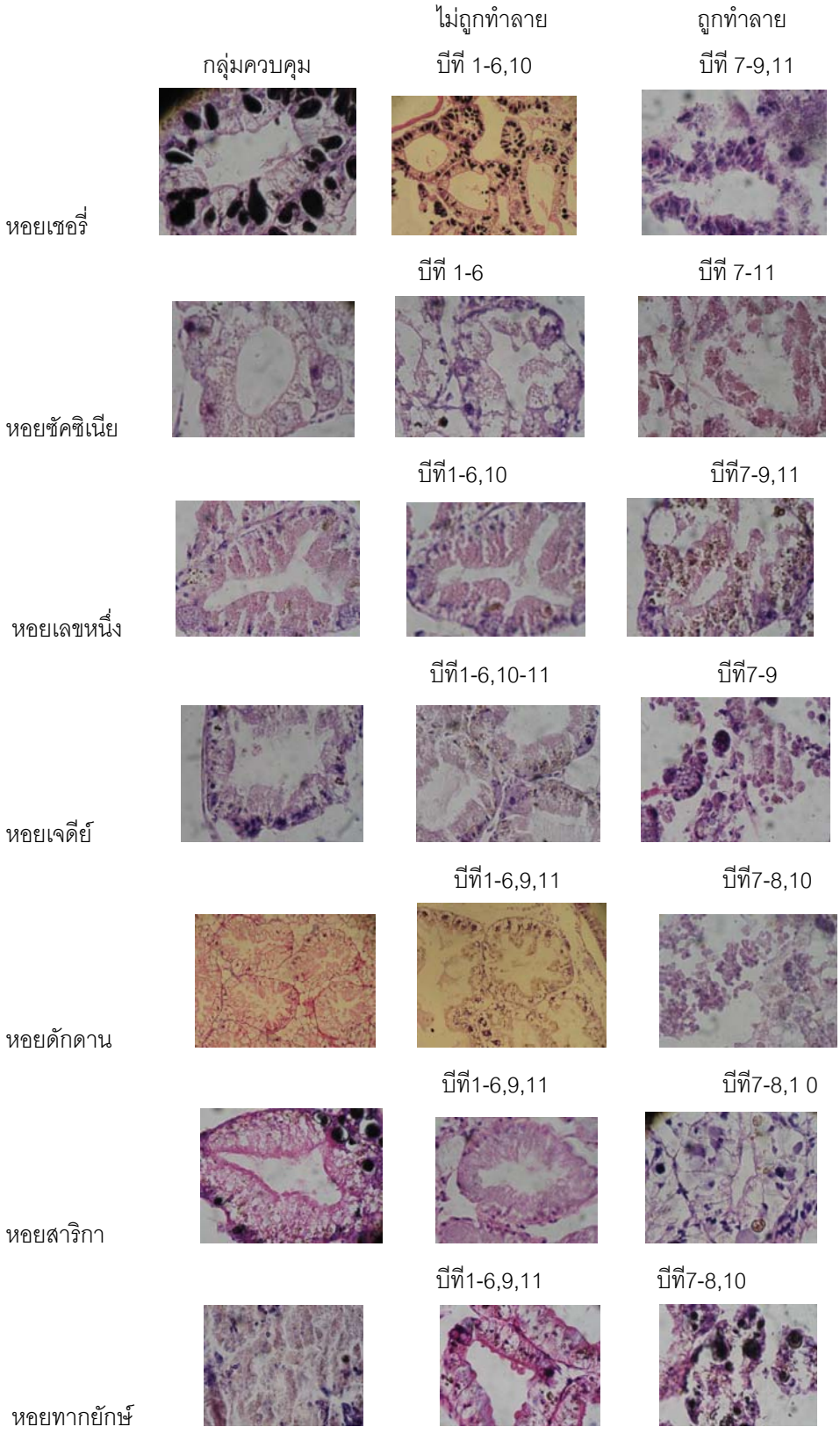
Jahan, M. S. and S.K. Raut. 1994. distribution and Food preference of the giant African land snail, *Achatina fulica* Bowdich in Bangladesh J. Asia. Soci. Banglad. Sci. 20, 111-115.

Mead, A.R. 1979a. Economic malacology with Particular, reference to *Achatina fulica* pp. 150. In V. Fretter and J.Peake. (ed.) Pulmonattes. Vol. 2b. Academic Press, London.

Rueda, A. 1989 a. Biology nutritional ecologyn and natural enemies of the slug *Sarasinula plebeia* Msc. Thesis ,University of florida Gainesville Florida.

Srivastava, P.D. 1992. Problem of Land Snial Pests in Agriculture a Study of the Giant African Snail Concept Publishing Company, New Delhi 234 p.

ภาพที่ 1. เซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะตับของหอยเชอรี่ หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ที่48 และ 72 ชั่วโมงสำหรับหอยดักดาน หอยสาริกา หอยทากยักษ์ที่ทดสอบด้วยบีที 11 สายพันธุ์



คัดเลือกสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยและทดสอบประสิทธิภาพควบคุมหอยทากบกและหอยเชอรี่

Efficacy Test and Nematodes Selection for the Controlling Land Snail and Golden Apple Snail

ปราสาททอง พรหมเกิด ชมพูนุท จรรยาเพศ
วิไลวรรณ เวชยันต์ สาทิพย์ มาลี

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย 5 สายพันธุ์ คือ*Steinernema capocapsae, S. siamkoyai , S. riobave, S .glaseri* และ *Heterorhabditis bacteriophora* กับหอยเชอรี่ และหอยทากบก 5 ชนิด ในห้องปฏิบัติการตามแผนการทดลอง CRD 4 ซ้ำ หลังทดสอบ 72 ชั่วโมง พบว่าหอยเชอรี่ที่ใช้ไส้เดือนฝอยความเข้มข้น 100,000 ตัวต่อบิคเกอร์ หอยตาย 75.0 ± 0.95, 75.0 ± 0.5, 66.0 ± 0.8 , 91.0 ± 0.5 และ 8.33 ± 0.5 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 % หอยเลขหนึ่ง และหอยเจดีย์ ที่ความเข้มข้น 20,000 ตัว หอยเลขหนึ่งตาย 45.0 ± 1.89, 15.0 ± 0.95, 95.0 ± 0.5ล 85.0 ± 0.95 และ 5.0 ± 0.5 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 % ส่วนหอยเจดีย์ตาย 0 % ทุกกลุ่มหอย หอยดักดาน หอยสาริกาและหอยทากยักษ์ใช้ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 50,000 ตัวต่อกล่อง หอยดักดานตาย 50.0 ± 0.7, 50.0 ± 0.7 , 100 , 100 และ 0 % ตามลำดับ หอยสาริกาตาย 16.7 ± 0.5 , 0,0, 83.33 ± 0.7 และ 0% ตามลำดับ และ หอยทากยักษ์ตาย 0, 50.0 ±2.12, 33.33 ±1.41,83.33 ± 0.7 และ 0 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 % ทำการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของหอยแต่ละชนิดหลังทดสอบด้วยไส้เดือนฝอยโดยทำสไลด์ถาวรที่ย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซินหลังทดสอบ 24,48และ72 ชม.พบไส้เดือนฝอยอยู่ในอวัยวะปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้ และท่ออวัยวะสืบพันธุ์ในหอยจึงเป็นสาเหตุให้หอยตาย ได้ทดสอบประสิทธิภาพ *Steinernema capocapsae* และ *S. riobave* กับหอยเชอรี่ หอยเลขหนึ่ง หอยดักดาน หอยสาริกาและหอยทากยักษ์ในอ่างซีเมนต์โดยใช้ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดอัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่นและผสมกับอาหารให้หอยกินเทียบกับกรรมวิธีควบคุมหลังทดสอบ 4วันไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดทำให้หอยเชอรี่ตาย 18.75-43.75% หอยเลขหนึ่งตาย 10.0-2705% ส่วน หอยดักดาน หอยสาริกา และ หอยทากยักษ์ไม่ตายในทุกกรรมวิธี

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-03-02-51

คำนำ

หอยฝาเดียว (gastropods) มีแหล่งที่อยู่อาศัยได้ทั้งในน้ำและบนบกบางชนิดสามารถอาศัยได้บนต้นไม้ตลอดชีวิตของมัน จึงกินอาหารได้หลากหลายทั้งพืชน้ำ พืชผัก ผลไม้ บางชนิดเป็นผู้ล่าสัตว์อื่นเป็น อาหาร บางชนิดกินซากพืชซากสัตว์ บางชนิดเป็นพาหะนำโรคและมีหอยหลายชนิดที่กินพืชอาหารของมนุษย์จึงกลายเป็นศัตรูของมนุษย์ และหอยมีการเคลื่อนที่ได้ไกลจึงทำความเสียหายให้กับพืชอาหารอย่างมาก เช่น หอยเชอรี่เป็นหอยน้ำจืดกินพืชผักเศรษฐกิจที่อยู่ในน้ำหลายชนิด เช่น ผักบุ้ง ผักกระเฉด บัว กระจับเป็นต้นโดยเฉพาะข้าวจะกัดกินในระยะกล้าอายุ 10 – 30 วัน(ชมพูนุทและคณะ 2532) เกษตรกร มีวิธีการต่างๆ ป้องกันกำจัดหอยเชอรี่ เช่น วิธีเขตกรรมด้วยการใช้ตาข่ายขวางทางน้ำเข้าออก ใช้ชีววิธีด้วยการปล่อยเป็ดลงไปกินลูกหอย วิธีกลด้วยการเก็บทั้งตัวและไข่หอยออกมาทุบทำลายหรือนำไปเป็นอาหารสัตว์ นำไปทำปุ๋ยหมัก แต่หอยก็ยังระบาดทำลายอยู่ เนื่องจากหอยเชอรี่สามารถเพิ่มประชากรได้อย่างรวดเร็ว สามารถวางไข่มากถึง 3,000 ฟองต่อกลุ่ม และฟักเป็นลูกหอยได้มาก 90 % (ชมพูนุทและคณะ 2534) นอกจากนี้ยังมีหอยทากบกหลายชนิดเป็นศัตรูพืชทั้งพืชผัก ผลไม้ และไม้ดอก ได้แก่ หอยสาริกา หอยดักดาน หอยทากยักษ์ หอยเจดีย์ เป็นต้น โดยจะกัดกินทั้งราก ลำต้น ใบ ดอก และผลของพืช โดยเฉพาะต้นกล้าพืชเกือบทุกชนิดจะถูกกัดกินได้รับความเสียหายอย่างมาก (Jahan and Raut , 1994) และยังกัดกินส่วนต่างๆของพืชทำให้เกิดความเสียหายจนชะงักการเจริญเติบโต (Srivastava ,1992) แม้ กระทั่งส่วนลำต้น รากที่เก็บสะสมอาหารอยู่ใต้ดินยังถูกกัดกิน (Barker and Addison ,1992) นอกจากนี้หอยทากบกจะมีเมือกจำนวนมาก เมื่อกัดกินพืชและคลานไปบนส่วนต่างๆ ของพืชจะเป็นพาหะนำโรคพืชระบาดได้ (Watson et. al. ,1989) และอาจนำโรคมาสู่มนุษย์หรือสัตว์อื่นๆ ตลอดจนทำให้เกิดความสกปรกหรือก่อความรำคาญได้ จึงมีการป้องกันกำจัดหอยเหล่านี้หลากหลายวิธีตามความเหมาะสมของหอยแต่ละชนิด แต่ที่นิยมนำมาใช้คือการใช้สารเคมีกำจัด เช่น ใช้เมทัลดีไฮด์ที่มีทั้งชนิดผงและเหยื่อพิษ กำจัด(Port and Port ,1986) การทำความสะอาดแปลงปลูกด้วยการกำจัดวัชพืชที่ขึ้นปกคลุมทำให้แหล่ง อาศัยหมดไปเป็นการช่วยลดประชากรได้ (Stringer et. al. 1974) การเก็บทั้งตัวและไข่หอยออกไปทำลาย จะทำให้ปริมาณหอยลดลง การใช้ชีววิธีก็เป็นวิธีการหนึ่งที่นำมาใช้ควบคุมประชากรหอย เช่น ปล่อยเป็ด ไก่ กินหอยบริเวณบ้านที่อยู่อาศัยหรือโรงเรือนปลูกพืช การใช้ไส้เดือนฝอย *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Schneider) มากำจัดหอยในแปลงปลูกพืชในช่วงเวลาที่เหมาะสม สามารถทดแทนการใช้สารเคมีได้ (Glen et. al.,1998) ซึ่งการใช้ชีววิธีมาป้องกันกำจัดเป็นวิธีการที่ค่อยข้างปลอดภัยต่อผู้ใช้และสภาพแวดล้อม เพราะมีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อเหยื่อ ดังนั้นจึงมีการศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพฆ่าหอยเชอรี่และหอยทากบกที่เป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในสภาพไร่ของเกษตรกรต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง
   - ไส้เดือนฝอย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Steinernema capocapsae, S. siamkoyai , S. riobave*, *S. glaseri* และ *Heterorhabditis bacteriophora*
   - หอยเชอรี่ หอยทากบก 5 ชนิดได้แก่ หอยเลขหนึ่ง หอยเจดีย์ หอยทากยักษ์ หอยสาริกา และ หอยดักดาน
2. เครื่องมือ
   - กล่องพลาสติกขนาด 75และ 300 ตารางเซนติเมตร
   - บีคเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
   - กระดาษทิชชู
   - กล้องจุลทรรศน์และกล้องสเตอริโอ
   - อ่างซีเมนต์ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 1เมตรที่บรรจุดิน และอาหารเลี้ยงหอย
   - เครื่องมือทางเนื้อเยื่อวิทยา
   - สีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน

วิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

1.1 ไส้เดือนฝอยทั้ง 5 สายพันธุ์ได้มาจากกลุ่มงานชีววิธี กลุ่มกีฏและสัตววิทยาที่เตรียมอยู่ในรูปของความเข้มข้นที่นับจำนวนประชากรไส้เดือนฝอยแล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.2 หอยชนิดต่างๆ

- หอยเชอรี่เก็บจากแปลงนาเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรีมาเลี้ยงในอ่างซีเมนต์ที่โรงเรือนของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ให้อาหารปลาชนิดเม็ดและพืชน้ำ เช่น จอก แหน สาหร่าย เป็นต้น
- หอยทากบก 5 ชนิดได้แก่ หอยเลขหนึ่ง และหอยเจดีย์ เก็บรวบรวมจากแปลงสวนกล้วยไม้จังหวัดกาญจนบุรีจังหวัดสมุทรสาครมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด300ตารางเซนติเมตรเพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดลอง ส่วน หอยทากยักษ์ หอยสาริกา หอยดักดาน เก็บรวบรวมจากสวนผลไม้ของเกษตรกรจังหวัดจันทบุรี จังหวัดลพบุรีมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกขนาด300ตารางเซนติเมตรเพื่อเตรียมไว้สำหรับการทดลองต่อไป

2. การทดลอง ปี 2549

2.1 หอยเชอรี่คัดเลือกหอยตัวเต็มวัยและสมบูรณ์มาใส่บีคเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำไว้แล้ว 300 มิลลิลิตร บีคเกอร์ ละ 3 ตัว เมื่อหอยเปิดฝาเคลื่อนที่แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน

100,000 ตัวต่อบีคเกอร์ตามแผนการทดลอง 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ หลังทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจดูการตายของหอยแต่ละกรรมวิธี

2.2 หอยเลขหนึ่ง และหอยเจดีย์คัดเลือกหอยที่สมบูรณ์มาใส่กล่องพลาสติกขนาด 75 ตาราง เซนติเมตร จำนวนชนิดละ 5 ตัวต่อกล่อง แต่ละกล่อง ที่พื้นกล่องบุด้วยกระดาษทิชชูที่ฉีดน้ำพอชุ่มชื้น เมื่อหอยคลานดีแล้วใส่ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดจำนวน 20,000 ตัวต่อกล่อง ตามแผนการทดลอง 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ หลังทดสอบ 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจดูการตายของหอยภายใต้กล้องสเตอริโอ

2.3 หอยทากยักษ์ หอยดักดานและหอยสาริกา คัดเลือกหอยที่สมบูรณ์มาใส่กล่องพลาสติกขนาด 300 ตารางเซนติเมตร จำนวน 3 ตัวต่อกล่อง โดยพื้นกล่องจะบุด้วยกระดาษทิชชูฉีดน้ำพอชุ่มชื้น เมื่อหอยคลานดีแล้วใส่ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดจำนวน 50,000 ตัวต่อกล่องตามแผนการทดลอง 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ หลังทดสอบ 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจดูการตายของหอยภายใต้กล้อง สเตอริโอ

3. การทดลอง ปี 2550 ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาด้วยการเก็บหอยแต่ละชนิดที่มีชีวิตมาคงสภาพด้วยฟอร์มาลีน 10%แล้วผ่านขบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาได้สไลด์ถาวรที่ย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซินตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. การทดลอง ปี 2551-2552 ทดสอบประสิทธิภาพ *Steinernema capocapsae* และ *S. riobave* กับหอยเชอรี่ หอยเลขหนึ่ง หอยดักดาน หอยสาริกา และหอยทากยักษ์ในอ่างซีเมนต์โดยใช้ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดอัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่นและผสมกับอาหารให้หอยกิน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ให้น้ำและอาหารหอยปกติ

5. บันทึกข้อมูล

- อัตราการตายของหอยแต่ละชนิดที่ 24 , 48 และ72 ชั่วโมง และ 4วัน
- การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหอยชนิดต่างๆ

เวลาและสถานที่

เวลาดำเนินการ ระยะเวลา 4 ปี เริ่มตุลาคม 2548 สิ้นสุดกันยายน 2552

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี2549 จากการทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย 5 สายพันธุ์ได้แก่ *S. capocapsae, S. siamkoyai , S. riobave*, *S. glaseri* และ *Heterorhabditis bacteriophora* กับหอยเชอรี่และหอยทากบก 5 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่พ่นด้วยน้ำพบว่า

หอยเชอรี่ ที่72ชั่วโมงหลังทดสอบไส้เดือนฝอยที่ความเข้มข้น100,000ตัวต่อบีคเกอร์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าหอยตายเป็น 75.0 ±0.95 ,75.0 ±0.5 ,66.0 ±0.8 ,91.0 ± 0.5 , 8.33 ± 0.5 และ 0 % ตามลำดับ

หอยเลขหนึ่ง ที่72ชั่วโมงหลังทดสอบไส้เดือนฝอยที่ความเข้มข้น 20,000 ตัวต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าหอยตายเป็น 45.0 ±1.89 ,15.0 ± 0.95 , 95.0 ± 0.5 , 85.0 ± 0.95 , 5.0 ± 0.5 และ 0% ตามลำดับ

หอยเจดีย์ที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบไส้เดือนฝอยที่ความเข้มข้น 20,000 ตัวต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าหอยตายเป็น 0 % ทุกกรรมวิธีเท่ากับกลุ่มควบคุม

หอยดักดานที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบไส้เดือนฝอยที่ความเข้มข้น 50,000 ตัวต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าหอยตายเป็น 50.0 ±0.7,50.0 ±0.7, 100 , 100 , 0 และ0 % ตามลำดับ

หอยสาลิกา ที่ 72 ชั่วโมง หลังทดสอบไส้เดือนฝอยที่ความเข้มข้น 50,000 ตัวต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าหอยตายเป็น 16.7 ± 0.5 , 0 , 0 , 83.33 ± 0.7 , 0 และ0 % ตามลำดับ

หอยทากยักษ์ ที่72ชั่วโมงหลังทดสอบไส้เดือนฝอยที่ความเข้มข้น 50,000 ตัวต่อกล่อง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าหอยตายเป็น 0 ,50.0 ±2.12 , 33.33 ±1.41 , 83.33 ± 0.7 , 0 และ0 % ตามลำดับ

ปี 2550 ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของหอยแต่ละชนิดพบว่าหลังทดสอบ 24,48และ72 ชม.พบไส้เดือนฝอยอยู่ในอวัยวะปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้และท่ออวัยวะสืบพันธุ์ในหอยจึงเป็นสาเหตุให้หอยตาย (ภาพที่ 1)

ปี 2551-2552 ทดสอบประสิทธิภาพ *S. capocapsae* และ *S. riobave* กับหอยเชอรี่ หอยเลขหนึ่ง หอยดักดาน หอยสาริกา และ หอยทากยักษ์ในอ่างซีเมนต์

หอยเชอรี่ ที่ทดสอบใช้ไส้เดือนฝอย *S. capocapsae* และ *S. riobave* อัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่นและผสมกับอาหารให้หอยกินเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังทดสอบ 4วัน หอยตาย 31.25,18.75,31.25,43.75และ 0% ตามลำดับ

หอยเลขหนึ่ง ที่ทดสอบใช้ไส้เดือนฝอย *S. capocapsae* และ *S. riobave* อัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่นและผสมกับอาหารให้หอยกินเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังทดสอบ 4วัน พบหอยตาย 10.0, 27.5, 20.0, 20.0 และ 0 % ตามลำดับ

หอยดักดาน ที่ทดสอบใช้ไส้เดือนฝอย *S. capocapsae* และ *S. riobave* อัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่น และ ผสมกับอาหารให้หอยกินเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังทดสอบ 4 วัน พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองหอยไม่ตาย

หอยสาริกา ที่ทดสอบใช้ไส้เดือนฝอย *S. capocapsae* และ *S. riobave* อัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่น และ ผสมกับอาหารให้หอยกินเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังทดสอบ 4 วันพบว่า ทุกกลุ่มทดลองหอยไม่ตาย

หอยทากยักษ์ ที่ทดสอบใช้ไส้เดือนฝอย *S. capocapsae* และ *S. riobave* อัตราความเข้มข้น 1.5ล้านตัว/อ่างด้วยการพ่น และ ผสมกับอาหารให้หอยกินเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังทดสอบ 4 วันพบว่า ทุกกลุ่มทดลองหอยไม่ตาย

จากผลการทดลองไส้เดือนฝอยทุกสายพันธุ์สามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้ โดยเฉพาะฆ่าหอยได้มากถึง 91% ส่วน *H. bacteriophora* ไม่สามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้และเมื่อนำมาทดสอบกับหอยทากบกคือ หอยเลขหนึ่ง พบว่ามีประสิทธิภาพฆ่าหอยได้ สำหรับหอยเจดีย์นั้นไส้เดือนฝอยไม่สามารถฆ่าได้ หากเป็นเพราะ แบคทีเรียไม่เฉพาะเจาะจงกับหอยเจดีย์ ส่วนหอยดักดาน หอยสาริกา และ หอยทากยักษ์ *S. riobave* และ *S. glaseri* มีประสิทธิภาพ ฆ่าหอยได้ แสดงว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเข้าไปในลำตัวหอยแล้วปล่อยแบคทีเรียเข้าไปในช่องว่างลำตัวหอยได้ สอดคล้องกับรายงานของ วัชรี(2546) ที่เป็นกลไกการทำลายของแมลงหรืออาจจะเป็นเพราะไส้เดือนฝอยสร้างสารพิษทำให้หอยตายได้ดังรายงานผลที่เกิดกับแมลง เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบไส้เดือนฝอยอยู่ในอวัยวะปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้และท่ออวัยวะสืบพันธุ์ จึงเป็นการสนับสนุนถึงการตายของหอย

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าไส้เดือนฝอยสามารถฆ่าหอยเชอรี่ได้โดยเฉพาะ *S .glaseri* ฆ่าหอยได้ถึง 91 % ส่วน *H. bacteriophora* ไม่สามารถฆ่าหอยได้ และไม่มีไส้เดือนฝอยชนิดใดฆ่าหอยเจดีย์ได้ ส่วนหอยเลขหนึ่ง หอยสาริกา หอยดักดานและหอยทากยักษ์ *S. riobave* และ *S. glaseri* สามารถฆ่าหอยได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ยังจะพบได้ว่า , *S. riobave* และ *S .glaseri* น่าจะมีแนวโน้มในการนำไปประยุกต์ใช้กำจัดหอยทากบกได้เมื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบไส้เดือนฝอยอยู่ในอวัยวะปอด กระเพาะอาหาร ลำไส้และท่ออวัยวะสืบพันธุ์ และเมื่อนำ *S. capocapsae* และ *S. riobave* มาทดสอบกับหอยเชอรี่ในอ่างซีเมนต์ พบว่าหอยตาย43.75% ส่วน หอยเลขหนึ่งตาย10.0-2705% หอยดักดาน หอยสาริกาและหอยทากยักษ์ไม่ตาย จะต้องศึกษาทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชมพูนุท จรรยาเพศ ทักษิณ อาชวาคมและทรงทัพ แก้วตา. 2532. ทดสอบอัตราการกินต้นข้าวของหอยเชอรี่.รายงานผลการด้านค้นคว้าและวิจัยกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพ ฯ หน้า 115 – 125.

_____.2534. ชีววิทยาชองหอยเชอรี่.รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพ ฯ หน้า 94 – 102.

Barker, G.M. and P.J.Addison.1992.Pest status of slug in two Newzealand Pastures. Crop Protection11:439 – 442.

Glen,O.M.,M.J.Wilson,L.Hughes,P.Cargeeg and A.Hajijar.1996.Exploring and exploiting the potential of the rhabditid nematode *Phasmarhabditis hermaphradita* as a biocontrol agent for sluge. PP.271 – 280. In LF. Hendensom (ed.) Slug and Snail Pests in Agriculture.Monograph No.66,British crop Protection Council, Farsham.

Jahan,M.S. and S.K. Raut. 1994.Distribution and food preference of the giant African land snail, *Achatina fulica* Bowdich in Bangladesh. *J*. Asia Soci . Banglad. Sci .20: 111 – 115.

Port, G.R.,J.M. Hogan and C.M. Port.1992.Factors affecting the time of slug control in winter wheat. PP.257 –261.In.Proceeding of the ninth International Malacological Congress,1986.Unitas Malacologica, the Netherlands,

Srivastava,P.P. 1992. Problem of land Snail Pests in Agriculture a study of the Giant African Snail Concept Publishing of Company, New Delhi. 234 P.

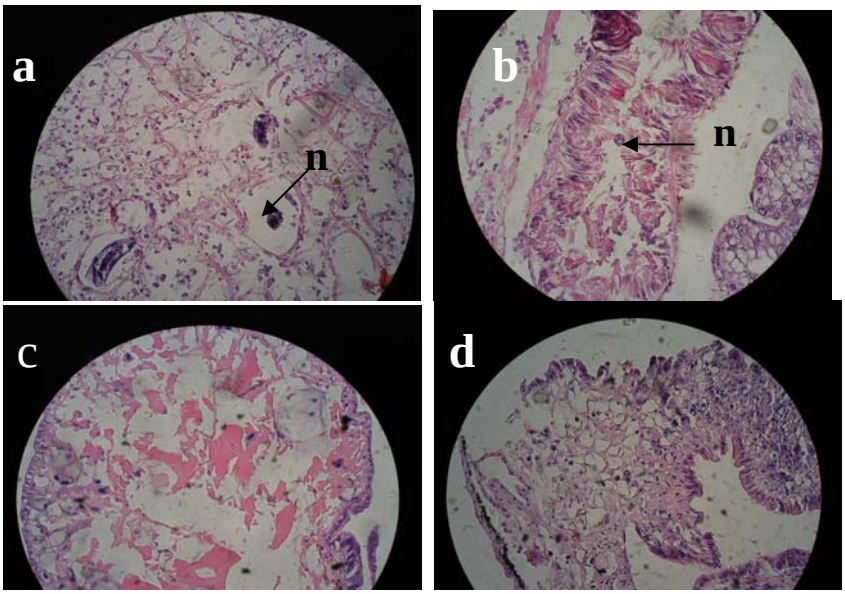
Stringer,A.,C.H.Lyons and N.C.Morgan. 1974. Report of Long Ashton Research station for 1973,Long Ashton Research Station, Bristol. P.122 – 123.

Watson,R.N.,R.A. Skipp and B.I.P. Barratt. 1989. Initatives in Pest and disease control in New Zealand towards in proving legume production and persistenu. PP.441 – 464. In. G.C.Marten, A.Q.Matches,R.F.Barnes, R.W. Brongham, R.J.Clemeats and G.W. Sheathc (ed.),Persistence of Forage Legumes. American society of Agronomy crop Science Society of America / Soil Science Society of America, Madison Wisconsin.

ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อหอยที่ย้อมสีฮีมาท็อกไซลินและอีโอซิน (40x)

a,ไส้เดือนฝอยในเนื้อเยื่อปอด b, ไส้เดือนฝอยในเนื้อเยื่อลำไส้เล็ก

c, เนื้อเยื่อปอดถูกทำลาย d, เนื้อเยื่อปอดปกติ n. ไส้เดือนฝอย



การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

Formulation of *Bacillus subtilis* Endospore for Controlling Ginger Wilt

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ในปีที่ 1-3 (ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551) ได้ทำการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง เริ่มจากการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B.subtilis* จำนวน 21 สูตร ทดสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอ็นโดสปอร์ ได้แก่ ทดสอบความเร็วรอบในการเขย่าเพื่อการบ่มเชื้อ อุณหภูมิ และแสงที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ทดสอบความทนทานของ *B.subtilis* ที่อยู่ในระยะเอ็นโดสปอร์ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ และศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B.subtilis* ในรูปเอ็นโดสปอร์ ผลการทดลองพบว่า อาหารสูตร N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงถึง10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสูตร N3 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงสุดถึง 3.10 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 480 ชั่วโมง (20 วัน) และสูตร FFS1 สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ 2.1 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (5 วัน) การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิปกติ (26 องศาเซลเซียส) ภายใต้แสงธรรมดา เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* ในการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ และพบว่าแบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 องศาเซลเซียสและสูงถึง 100 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ที่อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส) ในการทดสอบการแปรรูปผลิตภัณฑ์ในรูปของเหลว ผลการทดลอง พบว่า หลังการทดสอบ 3 เดือน ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารนำพา (หางนม) ลดลงเพียงเล็กน้อย คือจาก 1.1 x 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร เป็น 0.2x 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร แต่หลังเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว จาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนี/มิลลิลิตร การทดสอบการแปร

รหัสการทดลอง 07-01-49-06

รูปผลิตภัณฑ์ในรูปผง พบว่า หลังการแปรรูปปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นมีปริมาณเท่ากันคือ10^8 โคโลนี/มิลลิลิตร แต่การใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารนำพามีข้อเสียคือ การเกาะติดค่อนข้างยาก เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีลักษณะมันลื่น ต้องใช้เวลานานในการคลุกเคล้า ข้อดีคือ ผลิตภัณฑ์ละลายน้ำได้ดี ในขณะที่การใช้สารทัลคัม การละลายน้ำจะมีตะกอนตกค้าง หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 เดือนพบว่า ปริมาณเอ็นโดสปอร์ยังไม่แตกต่างกันและยังไม่ลดลง หลังการเก็บรักษา 7 เดือน พบว่า ปริมาณแบคทีเรียจากทั้งสองผลิตภัณฑ์มีปริมาณเท่ากันแต่ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากการเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร PSA ซึ่งไม่มีการกระตุ้นให้สร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่มีแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่มีชีวิตรอด เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตพบว่า ราคาของสารนำพาทั้งสองชนิดที่นำมาใช้แปรรูปไม่แตกต่างกัน ในปี 2550-2551 ได้ทำการปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลวโดยลดปริมาณหางนมซึ่งใช้เป็นสารนำพา ลง 2 เท่า ศึกษาการเก็บรักษา และทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เหลวในโรงเรือนทดลอง ผลการทดลองพบว่าการปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยลดหางนมลง 2 เท่า พบว่า ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีค่าไม่คงที่ แต่ปริมาณกลับเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน และไม่มีความแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมหางนม แต่จะมีปริมาณมากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร PSB เปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติและในตู้เย็นพบว่าเมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือนปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยในสภาพอุณหภูมิปกติมีปริมาณมากกว่าที่เก็บในตู้เย็นแต่สำหรับผลิตภัณฑ์ผงปริมาณเซลBsที่มีชีวิตรอดมีปริมาณลดลงเท่ากันทั้ง2แหล่งเก็บ

ปีที่ 4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552) ได้ทำการทดสอบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลวเอ็นโดสปอร์โดยการเติมและไม่เติมหางนมเป็นสารนำพา เก็บในสภาพอุณหภูมิปกติและอุณหภูมิต่ำ ผลการทดลองพบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* จากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 การเติมหางนมลงเป็นสารนำพา ปริมาณการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไม่แตกต่างกับการไม่เติมหางนม เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติเป็นเวลา 6 เดือน และพบว่า ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB การเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในสภาพโรงเรือน พบว่า การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุด และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมาก ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา การควบคุมโรคด้วยสารเคมีค่อนข้างยาก และมักก่อให้เกิดผลกระทบต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อมตามมา จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีควบคุมโรคเหี่ยวที่มีความปลอดภัยหลายวิธี เช่น การเขตกรรม การปรับปรุงพันธุ์ และการควบคุมโรคโดยชีววิธีโดยการนำเชื้อจุลินทรีย์ ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist)

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นantagonist ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย จนกระทั่งแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เช่น เชื้อรา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ณัฏฐิมาและคณะ (2548) จึงได้ทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ และพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาการนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ทำโดยใช้สารละลายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์ และ/หรือราดลงบนดิน ซึ่งวิธีการปฏิบัติเช่นนี้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* มักไม่คงที่ เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง

เนื่องด้วยแบคทีเรียในสกุล*Bacillus* มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ที่เรียกว่าเอ็นโดสปอร์ (endospore) ซึ่งเป็นอวัยวะที่อยู่ในเซลแบคทีเรีย (vegetative cell) โดยเอ็นโดสปอร์จะมีผนังหนาคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น รังสี แรงกระแทก ร้อนจัดหรือเย็นจัดหรือสภาพขาดแคลนอาหาร และเอ็นโดสปอร์จะสามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell ได้ใหม่เมื่อใส่ลงไปในดินและสภาพแวดล้อมเหมาะสมและมีประสิทธิภาพควบคุมเชื้อโรคได้ทันที (http://www.splammo. net/bact102/102/bacillus.html) โดยมหาวิทยาลัยน้อททิ่งแฮม (University of Nottingham) ของประเทศอังกฤษได้ทำการศึกษาและคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* และรูปแบบผลิตภัณฑ์ในรูปของเอ็นโดสปอร์และได้รับการจดทะเบียนจาก EPA แล้วในชื่อ MBI 600 โดย มีคุณสมบัติทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถเก็บในสภาพแห้งได้ไม่ต่ำกว่า 2 ปี สามารถใช้ร่วมกับสารเคมีชนิดอื่นได้อย่างกว้างขวางและสปอร์สามารถงอกกลับมาเป็น vegetative cell และเข้าครอบคลุม (colonise) รากพืชได้ทันที เมื่อใส่ลงไปในดิน (http://www.microbiogroup.com/BS1.htm)

วาสนา และคณะ, 2547 ได้ศึกษาการยืดอายุผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* TISTR 001 เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ พบว่า ถ้าเติมสารตัวพา (carrier) ได้แก่ zeolite, talcum, และ calcium carbonate ลงไปในการรูปแบบผลิตภัณฑ์ชนิดผง แม้เพิ่มอุณหภูมิถึง 150 องศาเซลเซียสในระหว่างกระบวนการผลิตก็ตาม สปอร์ของแบคทีเรียก็สามารถทนอยู่ได้และจำนวนของเอ็นโดสปอร์ก็ไม่ลดลง และพบว่าความเข้มข้นของเอ็นโดสปอร์จะคงที่กว่าผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปของเหลว (http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc)

เพ็ญจันทร์,2546 ได้ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อขบวนการหมักสปอร์ของ *B.subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก พบว่า การใช้โมลาสและกากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหารที่ใช้หมัก จะสามารถกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* TISTR 001 ได้ถึง 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร

งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จของแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้อยู่ในรูปของเอ็นโดสปอร์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ ให้มีความคงทน เนื่องการมีชีวิตรอดในรูปสปอร์ของเชื้อ และสามารถนำไปใช้ได้ทุกสภาพแม้กระทั่งในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง โดยอาศัยคุณสมบัติความทนทานของเอ็นโดสปอร์และการงอกกลับมาเป็นเซลใหม่ได้โดยง่ายของเอ็นโดสปอร์ดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย *B.subtilis* 1 ไอโซเลท (ไอโซเลทที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* (ณัฏฐิมาและคณะ, 2547)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย PSA (Potato sucrose agar)
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องเขย่า (incubator shaker) ฯลฯ
4. สารเคมีในห้องปฏิบัติการ
5. สารที่ได้จากของเหลือภาคเกษตร เช่น หางนม กากน้ำตาล กากถั่วเหลือง โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก) ฯลฯ

วิธีการ

ปีที่1-3 (ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551)

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

สูตรอาหารทดสอบ (ภาคผนวก) ได้แก่

- **ชุดที่ 1** สูตรอาหารทั่วไป 15 สูตร ได้แก่ : CA MY NGA PSB (Wakimoto'broth) CPG YP NA NTG GMP B N1 N2 N3 N4 และ N5

- **ชุดที่ 2** สูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร ได้แก่ : SM1 SM2 FM1 FM2 FFS1 และ FFS2

ปฏิบัติดังนี้

1.1 การเตรียมหัวเชื้อ : เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *B. subtilis* บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียจำนวน 1 ลูป (loop) มาตรฐานลงในอาหารเหลว PSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟาสก์ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การทดสอบในสูตรอาหารต่างๆ : ถ่ายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ ซึ่งบรรจุอยู่ในฟาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 99 มิลลิลิตร นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

1.3 การบันทึกผล : ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 24 ชั่วโมง

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ปฏิบัติดังนี้

2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารสูตร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) โดยปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.2 นำไปบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ ได้แก่ 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 360 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

2.3 ตรวจผลโดยนับจำนวนเอ็นโดสปอร์โดยการย้อมสีและนับด้วย counting chamber ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *B.subtilis* สร้างขึ้น ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ปฏิบัติดังนี้

3.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารเหลว N1 N2 N3 N4 และ N5 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 240 ชั่วโมง

3.2 นำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 8 40 60 80 และ100 องศาเซลเซียสเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิปกติ (26 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

3.3 นำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA เพื่อนับจำนวนเซลที่มีชีวิตรอด โดยวิธี serial dilution plate method

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis*

4.1 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปของเหลว

4.1.1 <u>การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 4 เท่า</u>

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis*ในอาหารเหลว FFS1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ1) อัตรา 10 % ของปริมาตร

3. เติมหางนมลงไป 4 เท่า เขย่าให้เข้ากัน

4. บรรจุขวดแก้ว ปิดฝา วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4.1.2 <u>การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า</u>

ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 4.1 แต่ลดปริมาณหางนมลงเหลือ 2 เท่า

ตรวจนับเซลแบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับ การเลี้ยงบนอาหารเหลวFFS1 ที่ไม่มีการแปรรูปและในอาหาร PSB

4.2 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

1. ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับ การทดลอง 4.1 (ข้อ1-2)

2. เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลาย (ข้อ1)

3. เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน

4. นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ตรวจนับเซลแบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์แปรรูปแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ซึ่งปฏิบัติดังนี้

- เลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* บนอาหารแข็ง PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ขูดเซลแบคทีเรีย
- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- รินเอาส่วนใสมาผสมกับ Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1
- เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
- นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท เก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. ศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

5.1. <u>ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เหลว</u>

นำผลิตภัณฑ์เหลวที่ได้แยกเก็บเป็น 2 แหล่ง คือเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ตรวจผลจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดโดยวิธี serial dilution plate method ทุก ๆเดือน

5.2 ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

นำผลิตภัณฑ์ผงที่ปรุงแต่งโดยใช้ทัลคัมเป็นสารนำพา บรรจุในถุงพลาสติกปิดฝา แยกเก็บเป็น 2 แหล่ง คือเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิปกติ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ปฏิบัติเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์เหลว (ข้อ 5.1)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ชนิดผง

โดยวิธีการแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก

วิธีปฏิบัติ

1. นำดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วมาผสมกับ cell suspension ของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชม.

2. นำหัวพันธุ์ขิงที่ล้างทำความสะอาดแล้ว แช่ในผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ปริมาณความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชม.

3. ปลูกในดินที่เตรียมไว้ โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบคือ

- ปลูกขิงในดินที่ราดแบคทีเรีย *R. solanacearum* (C+)
- ปลูกขิงในดินอบฆ่าเชื้อ (C-)
- ปลูกขิงที่แช่ในผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ที่แปรรูปจากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PSA ปกติ

4. ตรวจผล โดยเช็คจำนวนต้นเหี่ยว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรค

ปีที่ 4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552)

1. เปรียบเทียบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว (Bs)

เปรียบเทียบวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว 3 รูปแบบ คือ

1. FFS1+ Skimmed milk : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร FFS1 บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 เติมหางนมเป็นสารนำพา
2. PSB + Skimmed milk : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร PSB บ่มเชื้อเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 เติมหางนมเป็นสารนำพา
3. FFS1 : เลี้ยง Bs ลงในอาหาร FFS1 บ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปแปรรูปตามวิธีการข้อ 4.1.2 แต่ไม่มีการเติมหางนม

2. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง

- เตรียมดินปลูกใส่กระถาง ปริมาณ 700 กรัมต่อกระถาง

- เพาะชำกล้าขิงในกระบะเพาะ ให้มีอายุประมาณ 45 วัน

- ทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในสภาพโรงเรือนทดลอง วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ อัตรา 70 กรัมต่อดิน 700 กรัม

กรรมวิธีที่ 2 ราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 50 มล. ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 3 ราดดินด้วยสารละลายเชื้อ Bs* อัตรา 100 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร 50 มล.ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 4 Control + ราดด้วยสารละลายเชื้อ Rs อัตรา 50 มล.ต่อกระถาง (ปริมาณ Rs เท่ากับ 1.8×10^9 cfu/ml.)

กรรมวิธีที่ 5 Control - ราดดินด้วยน้ำเปล่า

* การเตรียมสารละลายเชื้อ Bs ปฏิบัติโดยการเลี้ยง Bs บนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ จากนั้นนำมาทำเป็น cell suspension ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นจนได้ปริมาณเซล Bs ประมาณ 10^8 cfu/ml.

- ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นที่เป็นโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเปรียบเทียบกับจำนวนต้นทั้งหมด

3. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก

ทดสอบผลิตภัณฑ์ผงในแปลงปลูกที่ศูนย์วิจัยพืชสวนลำปาง อ.ห้างฉัตร จ.ลำปาง โดยวิธีรองก้นหลุมและแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกวางแผนการทดลองแบบ RCBD 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่หัวพันธุ์ขิงก่อนปลูกอัตรา 15 กรัม/น้ำ 10 ลิตร 30 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่หัวพันธุ์ขิงก่อนปลูกอัตรา 30 กรัม/น้ำ 10 ลิตร 30 นาที

กรรมวิธีที่ 3 หยอดก้นหลุมก่อนปลูกอัตรา 15 กรัม/หลุม

กรรมวิธีที่ 4 หยอดก้นหลุมก่อนปลูกอัตรา 30 กรัม/หลุม

กรรมวิธีที่ 5 Control

เวลาและสถานที่ **เริ่มต้น** ตุลาคม 2548 **สิ้นสุด** กันยายน 2552

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปีที่ 1-3 **(ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551)**

1. การทดสอบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ผลการทดลองพบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 วัน มีอาหาร 8 สูตรได้แก่ YP NB NTG GMP N1 B N2 และ N5 ที่แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ประมาณ 10^2สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 360 ชั่วโมง พบว่า *B.subtilis* สามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ในอาหารทั้ง 15สูตร โดยที่ในสูตร N3 และ N4 แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด เท่ากับ 2.13×10^6 และ2.34×10^6สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อจนครบ 480 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุดถึง10^8ในอาหาร 6 สูตร ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 และ N3 โดยมีปริมาณเอ็นโดสปอร์เท่ากับ 1.10×10^8 1.38×10^8 1.40×10^8 1.43×10^8 2.48×10^8 และ 3.10×10^8สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

การทดสอบสูตรอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *B.subtilis* ในอาหารที่มีส่วนผสมของเศษปลาหมักผสมกับกากถั่วเหลืองอัตรา 1:1 (FFS) แบคทีเรียสามารถสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ปริมาณสูงภายใน 5 วัน คือสร้างเอ็นโดสปอร์ได้ถึง 2.1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2)

ดังนั้นสูตรอาหารทีเหมาะสมในการนำไปแปรรูปคือ สูตร FFS1 ซึ่งมีส่วนผสมที่ราคาถูก หาง่าย และใช้เวลาในการเลี้ยงแบคทีเรียไม่นานมาก

2. การทดสอบความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์

ผลการทดลอง พบว่า หลังการเลี้ยงเชื้อในอาหาร N3 เป็นเวลา 360 วัน การเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียสร้างเอ็นโดสปอร์ได้สูงสุด โดยมีปริมาณเท่ากับ 7.1×10^8 และ 9.7×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ทั้งนี้โดยพบว่า การเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่ามากขึ้นซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะทำให้ปริมาณการสร้างเอ็นโดสปอร์เพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (ตารางที่ 3)

3. การทดสอบความทนทานของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทดสอบสามารถทนทานทั้งในสภาพอุณหภูมิต่ำ 8 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร 5 สูตร โดยพบว่า เมื่อแช่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียยังคงมีชีวิตรอดถึงประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลดปริมาณลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจากการทดสอบการทนทานในสภาพอุณหภูมิสูง พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิซึ่งใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูก แบคทีเรียสามารถมีชีวิตรอดประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยที่ปริมาณไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

อุณหภูมิห้อง 26 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^7โคโลนีต่อมิลลิลิตร และในสภาพอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส แบคทีเรียก็ยังคงมีชีวิตรอดถึง 10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4)

จากการทดลองนี้ การตรวจผลจำเป็นต้องใช้วิธีการนับโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี serial dilution plate method เพื่อตรวจสอบเซลที่มีชีวิตรอดเท่านั้น และจากลักษณะคุณสมบัติของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ถ้าแบคทีเรียอยู่ในสภาพเป็นเซลและยังไม่สร้างเอ็นโดสปอร์ แบคทีเรียสามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส (http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเซลแบคทีเรียจะตายลงจนไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยเฉพาะถ้าอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการที่โคโลนีแบคทีเรียยังสามารถเจริญอยู่ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส แสดงว่า เอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* เท่านั้นที่ยังทนต่อความร้อนและเจริญกลับมาเป็นเซลปกติได้ตามเดิม

4. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis*

4.1 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปของเหลว

4.1.1 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 4 เท่า

การทดลองแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยเติมหางนมลงไป 4 เท่า พบว่า หลังจากเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลา 2-3 เดือน ในสภาพอุณหภูมิห้อง ปริมาณเซลมีชีวิตของ Bs ลดลงไม่มากนัก แต่หลังจาก 3 เดือน ปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตเริ่มลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซลแบคทีเรียลดลงจาก 10^7 เป็น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเซลแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 ซึ่งไม่มีการแปรรูป พบว่า ปริมาณเซลแบคทีเรียยังมีปริมาณถึง 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

4.1.2 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า

การทดลองแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยลดปริมาณหางนมลง 2 เท่า ผลการทดลอง พบว่า หลังการเก็บ 1 เดือน ปริมาณเซลมีชีวิตของแบคทีเรีย Bs ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร แล้วเพิ่มปริมาณเป็น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเดือนที่ 2 จากนั้นลดลง เหลือ10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในเดือนที่ 3 และ4 และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน พบว่าปริมาณเซลที่มีชีวิตของ Bs กลับเพิ่มขึ้นเป็น 10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณเท่ากับในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร FFS1 ที่ไม่มีการเติมหางนม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยง Bs ในอาหารPSB ที่เติมหางนมลงไป 2 เท่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ครบ 5 เดือนปริมาณ Bs ลดลงเหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร(ตารางที่ 7)

4.2 ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

จากการทดลอง พบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์โดยใช้ ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารพาหะ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมคือผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปจากแบคทีเรียที่ล้างบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ พบว่า ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นไม่แตกต่างกัน คือเท่ากับ 10^8 cfu/ml. แต่เมื่อเก็บไว้ 5 เดือน พบว่า ไม่พบปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในกรรมวิธีควบคุม ในขณะที่กรรมวิธีที่แปรรูปจากการกระตุ้นเอ็นโดสปอร์ในอาหาร FFS1 ที่ใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพด ลดลงเหลือ 10^7 cfu/ml. (ตารางที่ 6)

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการผลิต พบว่า การใช้แป้งข้าวโพดจะค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีความมันลื่น การเกาะติดในขั้นตอนการผสมเชื้อค่อนข้างยาก ใช้เวลานาน แต่ข้อดีคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้ละลายน้ำได้ดีกว่าการใช้สารทัลคัม ไม่เหลือตะกอน และราคาไม่ต่างกัน

5. ศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

5.1. <u>ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เหลว</u>

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์เหลวที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs จากทั้ง 2 แหล่งเก็บ มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตรเป็น10^{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิห้องและในตู้เย็น ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

5.2 <u>ศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผง</u>

ผลการทดลองเปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ผงที่อุณหภูมิห้อง และเก็บในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ผงเป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs จากทั้ง 2 แหล่งเก็บ ลดลงเท่า ๆ กัน คือ จากปริมาณเริ่มต้น 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เหลือ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 8)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ชนิดผง

<u>โดยวิธีการแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก</u>

ในการทดสอบประสิทธิภาพผง ในโรงเรือน พบว่า ในกรรมวิธีเปรียบเทียบ (C-) ปริมาณต้นขิงที่ปลูกเปรียบเทียบงอกเจริญเป็นต้นไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ทำการทดสอบอีก 2 ครั้ง ก็ยังประสบปัญหาเดิม จึงไม่สามารถตรวจผลได้ ในปีพ.ศ.2551 จะทำการทดสอบอีกครั้งโดยปรับวิธีการ โดยเพาะหัวพันธุ์ขิงให้งอกก่อนทดสอบ และ อีกส่วนหนึ่งจะไปทำการทดสอบในระดับแปลงปลูกที่จังหวัดลำปาง

ปีที่4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552)

1. เปรียบเทียบการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว (Bs)

ผลการทดลอง พบว่า เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์เหลวในสภาพอุณหภูมิปกติ เป็นเวลา 6 เดือน ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1ทั้งที่เติมหางนม (FFS1+SM)

และไม่เติมหางนม (FFS) ในการแปรรูป มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB (PSB+SM) และพบว่า ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เหลว ของกรรมวิธีที่เลี้ยงในอาหาร FFS1 นั้นการเติมหางนมลงไปในการแปรรูป จะมีปริมาณแบคทีเรีย Bs ที่มีชีวิตรอดเท่ากับกรรมวิธีที่ไม่เติมหางนม เมื่อเก็บไว้ 6 เดือนในสภาพอุณหภูมิปกติ และการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ (ตารางที่ 10)

2. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดลอง พบว่า หลังการทดสอบ 60 วัน กรรมวิธีการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุดคือ 46.94% รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ และราดดินด้วย cell suspension ของ Bs โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 62.74 และ65.26 ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (Control+) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 83.72 ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ (ตารางที่ 11)

3. ทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก

ผลการทดลอง พบว่า หลังการตรวจผลที่ 2 เดือนหลังการทดสอบ พบว่า กรรมวิธีที่แช่หัวพันธุ์ก่อนปลูก มีอัตราการเกิดโรคเหี่ยวต่ำ โดยการแช่หัวพันธุ์ในอัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตร เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 15.7 แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์สถิติ พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ทั้งนี้การตรวจผลยังไม่สิ้นสุด และจะสรุปรวบรวม และวิเคราะห์ผลอีกครั้งหลังจากสิ้นสุดการเก็บเกี่ยวผลผลิต ประมาณเดือนกุมภาพันธ์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ปีที่ 1-3 (ต.ค. 2548 – ก.ย. 2551)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า มีอาหารที่ช่วยกระตุ้นการการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B.subtilis* สูงสุด ได้แก่ N1 B N2 N5 N4 N3 และ FFS1 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงถึง10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสูตร N3 สามารถกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *B.subtilis* ได้สูงสุดถึง 3.10×10^8 แต่สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูปคือสูตร FFS1 เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็น

สภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรียทดสอบ และพบว่า แบคทีเรีย *B.subtilis* สามารถทนอุณหภูมิได้ต่ำถึง 8 องศาเซลเซียสและสูงถึง 100 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกปริมาณเอ็นโดสปอร์ไม่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส

การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงโดยใช้สารทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาปริมาณเซลแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดหลังการเก็บ 7 เดือนไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณลดลงประมาณ 10 ล้านเซล ในขณะที่การแปรรูปจากแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร PSA โดยไม่มีการกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ ไม่พบการรอดของเซลแบคทีเรีย *B.subtilis* หลังการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ 5 เดือน

การปรับวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์เหลว โดยลดหางนมลง 2 เท่า พบว่า ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีค่าไม่คงที่ แต่ปริมาณกลับเพิ่มขึ้นจากปริมาณเซลเริ่มต้น เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน และไม่มีความแตกต่างกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมหางนม แต่จะมีปริมาณมากกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอาหาร PSB

เปรียบเทียบการเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิห้องปกติและในตู้เย็น พบว่า เมื่อเก็บเป็นเวลา 5 เดือน ปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอดมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยในสภาพอุณหภูมิปกติมีปริมาณมากกว่าที่เก็บในตู้เย็น แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ผงปริมาณเซล Bs ที่มีชีวิตรอด มีปริมาณลดลงเท่ากันทั้ง 2 แหล่งเก็บ

การทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์ผง จะทำการปรับวิธีการทดสอบในระดับโรงเรือนใหม่ในและจะทดสอบในระดับแปลงปลูกในปี พ.ศ.2551

ปีที่4 (ต.ค. 2551 – ก.ย. 2552)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* จากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 นั้น การเติมหางนมลงไปเป็นสารนำพาในผลิตภัณฑ์ ปริมาณการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียไม่แตกต่างกับการไม่เติมหางนม เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติเป็นเวลา 6 เดือน และพบว่า ผลิตภัณฑ์เหลวที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร FFS1 มีปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตสูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่ผสมปรุงแต่งจากการเลี้ยง Bs ในอาหาร PSB การเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ การมีชีวิตรอดของ Bs ในผลิตภัณฑ์ FFS1+SM และ PSB+SM มีปริมาณลดลงมากกว่า การเก็บในสภาพอุณหภูมิปกติ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *B. subtilis* ในโรงเรือนทดลอง พบว่าการคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ก่อนปลูก มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวขิงต่ำสุด รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ และราดดินด้วย cell suspension ของ Bs และทุกกรรมวิธีสามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

ทั้งนี้การคลุกดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่าการราดดินด้วยผลิตภัณฑ์ผงเอ็นโดสปอร์ละลายน้ำ

คำขอบคุณ

-

เอกสารอ้างอิง

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

Parry, J.M., P.C.B. Turnbull, and J.R. Gibson .1988. A Colot Atlas on Bacillus species. Wolfe Medical Publication Ltd. (http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_002c.asp?info_id=237)

Norris J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan, and A.G. O'Donnell. 1981. The genera *Bacillus* ana *Sporolactobacillus,* p. 1711-1742. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (ed.), The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria, vol. 2. Springer-Verlag, New York

Retrieve by http://www.splammo. net/bact102/102/bacillus.html

Retrieve by http://www. microbiogroup.com/BS1.htm

Retrieve by วาสนา กิตติกนกรัตน์, ไวรุจ เดชมหิธกุล และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง, 2547, "*Study of Formulation and Shelf-life of Bacillus subtilis TISTR 001 Product*", The 15th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, "Sustainable Development of SMEs Through Biotechnology http://www.nowledge.biotec.or.th/doc_upload /200411495822 .doc

Retrieve by http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/MM_404652038_12.doc

Retrieve by เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง,2546 การปรับปรุงผลผลิตของกระบวนการหมักสปอร์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 001 เพื่อเป็นโพรไบโอติก http://dcms.thailis.or.th/dcms/basic.php?institute_code=54&option=show&bib=193&query=Bacteria%20&doc_type=0

ปีที่ 1-3 (**ต.ค.** 2548 – **ก.ย.** 2551)

ตารางที่ 1 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร 15 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 240 360 และ 480 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)		
	240 ชั่วโมง (10 วัน)	**360 ชั่วโมง (15 วัน)**	480 ชั่วโมง (20 วัน)
CA	0	1.02×10^{2}	**1.42×10^{2}**
MY	0	3.36×10^{2}	**5.70×10^{3}**
NGA	0	7.28×10^{3}	**2.60×10^{5}**
PSB	0	8.48×10^{3}	**3.00×10^{5}**
CPG	0	8.97×10^{3}	**7.00×10^{5}**
YP	0	1.36×10^{4}	**1.04×10^{6}**
NB	1.3×10^{2}	6.45×10^{4}	**1.46×10^{6}**
NTG	1.27×10^{2}	8.38×10^{4}	**2.00×10^{6}**
GMP	1.63×10^{2}	3.94×10^{5}	**1.04×10^{7}**
N1	2.23×10^{2}	7.33×10^{5}	**1.10×10^{8}**
B	2.46×10^{2}	8.26×10^{5}	**1.38×10^{8}**
N2	3.34×10^{2}	8.28×10^{5}	**1.40×10^{8}**
N5	3.36×10^{2}	8.63×10^{5}	**1.43×10^{8}**
N4	0	2.13×10^{6}	**2.48×10^{8}**
N3	**0**	**2.34×10^{6}**	**3.10×10^{8}**

ตารางที่ 2 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหารที่มีส่วนผสมของส่วนเหลือจากภาคเกษตร 6 สูตร หลังการเลี้ยงเชื้อ 72 และ120 ชั่วโมง ตามลำดับ

สูตรอาหาร	ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่เวลาต่างๆ (สปอร์/มิลลิลิตร)	
	72 ชั่วโมง (3 วัน)	120 ชั่วโมง (5 วัน)
FFS1	1.9×10^6	**2.1×10^8**
FFS2	1.1×10^6	**9.6×10^7**
FM1	1.2×10^6	**7.3×10^7**
FM2	8.5×10^5	**8.2×10^6**
SM1	8.1×10^5	**2.0×10^6**
SM2	**2.8×10^5**	**1.9×10^6**

ตารางที่ 3 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ที่แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สร้างขึ้นในอาหาร N3 (Parry,J.M. และคณะ,1988) ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ เป็นเวลา 360 วัน ณ อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส)

ความเร็วรอบ (รอบต่อนาที)	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)**
50	4.10×10^6
100	5.60×10^6
150	7.10×10^8
200	9.70×10^8

ตารางที่ 4 ปริมาณเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอด ในอาหาร N3 (Parry,J.M.และคณะ,1988) ที่แช่ในน้ำอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที

อุณหภูมิ (^{0}C)	**ปริมาณเอ็นโดสปอร์ (สปอร์/มิลลิลิตร)**
8	9.20×10^6
26	1.60×10^7
40	1.90×10^7
60	1.38×10^6
80	1.43×10^4
100	1.38×10^4

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	ในอาหาร FFS1 +หางนม 4 เท่า	**ในอาหารFFS1**
0 [1/]	1.1×10^8	1.0×10^8
1	0.7×10^8	5.3×10^8
2	0.2×10^8	5.9×10^7
3	5.3×10^6	8.0×10^7
4	2.8×10^6	8.6×10^7
5	3.3×10^5	8.3×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารทัลคัม และแป้งข้าวโพดเป็นสารนำพาเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 7 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**		
	ทัลคัม (อาหาร FFS1)[2/]	**แป้งข้าวโพด (อาหาร FFS1)**[2/]	**ทัลคัม (อาหาร PSA)**[3/]
0 [1/]	1.2×10^8	1.5×10^8	2.1×10^8
1	0.9×10^8	0.6×10^8	1.5×10^8
2	1.7×10^7	1.5×10^7	2.0×10^8
3	2.2×10^7	1.7×10^7	1.5×10^7
4	1.3×10^7	1.5×10^7	4.3×10^7
5	3.2×10^7	3.0×10^7	0
6	1.0×10^7	9.0×10^7	0
7	1.5×10^7	2.5×10^7	0

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป [2/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร FFS1 ก่อนแปรรูป

[3/] ผลิตภัณฑ์แปรรูปที่เลี้ยงบนอาหาร PSA ก่อนแปรรูป

ตารางที่ 7. ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลวที่ใช้หางนมเป็นสารนำพา 2 เท่า เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่เลี้ยงในอาหารเศษปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง (FFS1) ที่ไม่มีการแปรรูป และในอาหาร PSB เก็บที่อุณหภูมิห้อง (25± 2 ^{0}C) เป็นเวลา 5 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**		
	ในอาหารFFS1 + หางนม 2 เท่า	**ในอาหารFFS1**	**ในอาหาร PSB + หางนม 2 เท่า**
0[1/]	5.3×10^8	5.5×10^8	8.5×10^8
1	1.0×10^7	8.3×10^8	1.0×10^6
2	7.5×10^8	4.0×10^8	2.0×10^5
3	1.0×10^7	5.0×10^9	4.0×10^6
4	5.0×10^7	1.1×10^{10}	1.0×10^7
5	6.1×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลว ที่เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) โดยใช้หางนม 2 เท่าเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)	**อุณหภูมิตู้เย็น** (4 °C)
0[1/]	5.3×10^8	5.3×10^8
1	1.0×10^7	2.5×10^8
2	7.5×10^8	1.5×10^{10}
3	1.0×10^7	2.6×10^5
4	5.0×10^7	4.9×10^{10}
5	6.1×10^{10}	6.5×10^9

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดผง ที่

เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) โดยใช้ทัลคัมเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)**	
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)	**อุณหภูมิตู้เย็น** (4 °C)
0[1/]	6.7×10^8	6.7×10^8
1	6.0×10^8	1.2×10^8
2	7.5×10^7	1.5×10^8
3	2.2×10^7	1.7×10^7
4	4.3×10^7	1.1×10^7
5	1.0×10^7	1.7×10^7

[1/] ปริมาณเซลแบคทีเรียเริ่มต้นหลังการแปรรูป

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์แปรรูปชนิดเหลว ที่เก็บที่อุณหภูมิปกติ (25±2 °C) อุณหภูมิตู้เย็น (4 °C) ที่เติมและไม่เติมหางนมเป็นสารนำพา

เดือนที่	**ปริมาณเซล** *Bacillus subtilis* (cfu/ml.)					
	อุณหภูมิปกติ (25±2 °C)			**อุณหภูมิตู้เย็น** (4 °C)		
	FFS1+SM	FFS1	PSB+SM	FFS1+SM	FFS1	PSB+SM
0	1.4×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9	1.4×10^9	1.7×10^9	1.0×10^9
1	4.0×10^8	2.0×10^8	1.0×10^7	1.0×10^7	6.0×10^6	3.6×10^7
2	1.0×10^7	9.0×10^7	5.0×10^6	4.0×10^7	1.1×10^7	2.1×10^7
3	5.0×10^7	2.0×10^7	5.0×10^6	1.0×10^7	3.0×10^6	1.2×10^7
4	2.0×10^7	7.0×10^8	8.0×10^6	9.0×10^6	8.0×10^7	3.2×10^6
5	5.0×10^7	8.2×10^8	4.0×10^6	8.5×10^6	3.0×10^7	2.0×10^6
6	1.5×10^7	9.0×10^7	5.0×10^6	2.0×10^6	1.0×10^7	2.0×10^6

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของขิงที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่ทดสอบการควบคุมด้วยผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ ที่ 15 30 45 และ60 วัน หลังการทดสอบ

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**			
	15 DAI	30 DAI	45 DAI	60 DAI
T1	34.88	44.44	45.83	46.94
T2	42.50	65.85	67.39	67.74
T3	43.53	56.32	67.77	68.26
T4	52.08	68.75	76.19	83.72
T5	0.00	0.00	0.00	0.00

ภาคผนวก

สูตรอาหารทดสอบ 15 สูตร

Malt-yeast extract (MY)

Malt extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10.00	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Peptone-calcium carbonate

Peptone	5	กรัม
$CaCO_3$	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

CPG

Casamino acid	1	กรัม
Peptone	10	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NGA

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

PSB (wakimoto'broth)

Potato	300	กรัม
Sucrose	20	กรัม
$Ca(Na_3)_2 4H_2O$	0.5	กรัม
$NaHPO_4 . 12H_2O$	2	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

B

Yeast extract	1	กรัม
Beef extract	3	กรัม

Peptone	5	กรัม
$MnSO_4 . H_2O$	50	มิลลิกรัม
$CaCl_2 . 2H_2O$	100	มิลลิกรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	500	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

GMP

Glucose	15	กรัม
Peptone	6	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

YP

Yeast extract	5	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NB

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

NTG

Glucose	20	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

N1 :Norris J.R และคณะ (1981)

Peptone	5	กรัม
Meat extract	3	กรัม
$Mn_2SO_4 . H_2O$	0.005	กรัม

	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N2 : Parry J.M และคณะ (1988)			
	$Mn_2SO_4.H_2O$	0.03	กรัม
	KH_2PO_4	0.25	กรัม
	Beef extract	3	กรัม
	Peptone	5	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N3 : Parry J.M และคณะ (1988)			
	Peptone	15	กรัม
	Yeast extract	3	กรัม
	NaCl	6	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N4			
	$Ca(Na_3)_24H_2O$	0.5	กรัม
	$NaHPO_4.12H_2O$	2	กรัม
	Peptone	15	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
N5			
	$Ca(Na_3)_24H_2O$	0.5	กรัม
	$NaHPO_4.12H_2O$	0.5	กรัม
	Peptone	5	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
SM1	กากถั่วเหลือง	10	กรัม
	กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	10	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
SM2			
	กากถั่วเหลือง	10	กรัม
	กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	5.0	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
FM1			
	ปลาป่น	10	กรัม
	กากน้ำตาล (โมลาสส์;cane molass)	10	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FM2

ปลาป่น	10	กรัม
โมลาสส์ (cane molass)	5.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FFS1

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)	10	มิลลิลิตร
กากถั่วเหลือง	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

FFS2

โปรตีนปลา (เศษปลาหมัก)	10	มิลลิลิตร
กากถั่วเหลือง	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

.....

Figure 1 *Bacillus subtilis* , on potato sucrose agar**,** 48 hours

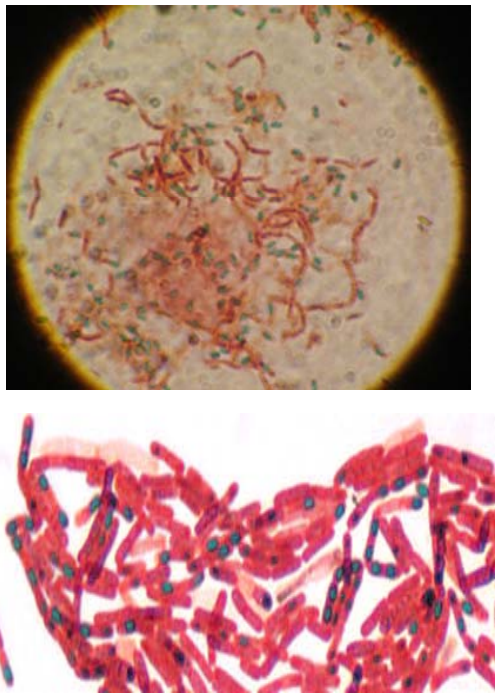


Figure 2 Endospore of *Bacillus subtilis* , malachite green stained (green color), 100 X

Figure 3 Liquid products of *Bacillus subtilis* endospore, skim milk added use for carrier

Figure 4 Wettable powder products of *Bacillus subtilis* endospore, talcum added use for carrier

การผลิตเชื้อปฏิปักษ์ต่อโรคเหี่ยวของมันฝรั่งปริมาณมากเพื่อเกษตรกร

Mess production of antagonistic bacterial against *Ralstonia solanacearum* causal agent of potato bacterial wilt

วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1]
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1] สุรีย์พร บัวอาจ[1] วิวัฒน์ ภานุอำไพ[2]
1/ กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2/ ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่

บทคัดย่อ

ตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Common micro flora) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายในห่วงลูกโซ่อาหาร (food chain) สามารถย่อยสลายวัสดุธรรมชาติได้อย่างกว้างขวาง สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ที่ทนต่อความแปรปรวนของสภาพธรรมชาติได้ดีโดยเฉพาะสภาพที่แห้งแล้งขาดแคลนอาหาร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติระหว่าง *B. subtilis* กับเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวแล้ว เชื้อ *B. subtilis* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติได้เหนือกว่าและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเจริญในอาหารนมได้เป็นอย่างดี จึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตใน ห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อนี้สามารถขยายเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่ 24-48 ชม.และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* และได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมาก ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์นี้และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บไดนาน 3 เดือน

คำนำ

Ralstonia solanacearum สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของโลกโรคหนึ่ง เพราะสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ มากกว่า 200 ชนิด และที่สำคัญยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีพอโดยเฉพาะการใช้สารเคมีไม่แนะนำให้ใช้แนวทางในการควบคุมโรคนี้ต้องเน้นที่การป้องกัน เพราะเชื้อสาเหตุโรคนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง สามารถอยู่รอดในดินได้ (soil born disease) สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้เป็นอย่างดี และที่สำคัญสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์พืชได้ ในประเทศไทยโรคนี้เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ

รหัสการทดลอง 07-01-49-06

หลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง พริกต่าง ๆ มะเขือต่าง ๆ งาและยาสูบ เป็นต้น สำหรับการป้องกันกำจัด มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* WB4 (BsWB4) ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ และพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ดังกล่าวเพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด ซึ่งถ้ามีการศึกษาหาวิธีการผลิตเชื้อ BsWB4 ในปริมาณมากเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ จะเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับเกษตรกรผู้เพาะปลูกพืชต่าง ๆ ที่ถูกเชื้อนี้เข้าทำลายโดยเฉพาะมันฝรั่ง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การทดสอบการอาหารเลี้ยงเชื้อหลาย ๆ ชนิด
2. การเชื้อในปริมาณมากด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคัดเลือกวิธีการที่เหมาะสมและคุ้มทุนที่สุด
3. เก็บรักษาเชื้อในรูปคลังเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียส
4. เปลี่ยนสภาพเซลล์ปกติเป็นเซลล์สปอร์
5. ผสมเชื้อเคลือบผิววัสดุแพร่กระจายเชื้อ (filler) อบแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส บรรจุภาชนะด้วยระบบ ไล่อากาศ (VIA pack)
6. ทดสอบการควบคุมโรคในแปลงเกษตรกรที่มีโรคดังกล่าวระบาดอย่างน้อย 4 แห่ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตรวจเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Common micro flora) เป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายในห่วงลูกโซ่อาหาร(food chain) สามารถย่อยสลายวัสดุธรรมชาติได้อย่างกว้างขวาง สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore) ที่ทนต่อความแปรปรวนของสภาพธรรมชาติได้ดีโดยเฉพาะสภาพที่แห้งแล้งขาดแคลนอาหาร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติระหว่าง *B. subtilis* กับเชื้อ *R. solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวแล้ว เชื้อ *B. subtilis* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในธรรมชาติได้เหนือกว่าและมีคุณสมบัติทางชีวเคมีในการเจริญในอาหารนมได้เป็นอย่างดี จึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพและได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมากได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง

จึงได้ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตใน ห้องปฏิบัติการของเชื้อ DOA-WB4 และทดสอบการเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารนมชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อนี้สามารถขยายเพิ่มปริมาณเชื้อได้ดีที่ 24-48 ชม.และมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* และได้วิธีการต่าง ๆ ที่ไปปรับให้เกษตรกรสามารถไปเลี้ยงเพิ่มเชื้อ DOA-WB4 ปริมาณมาก ได้มีการทดสอบพัฒนาเป็นชุดสำเร็จใช้ควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกษตรกรสามารถทำได้เอง จากการทดสอบความมีชีวิตของเชื้อปฏิปักษ์นี้และตรวจสอบอายุการใช้งานของชุดสำเร็จควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งพบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บได นาน 3 เดือน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

(อยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง)

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตตรา เอี่ยมวิจิตร 2540. การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2540 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 11 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุลและรุ่งนภา คงสุวรรณ์ 2546. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากน้ำและดินในเขตชลประทานพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2546 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtillis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S and Kato, H. 1998. The use of endophytic bacteria in biocontrol. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number 2.10.5s.

Asplras, R.B. and A.R. de le Cruz. 1986. Potential biological control of bacterial with in tomato and potato with Bacillus polymyxa FUB and *Pseudomonas fluorescens*. In:Persley, G.J. (ed.). Bacterial wilt disease in Asia and the south Pacific. ACIAR Proceedings 13, Canberra, Australia. P. 69-92.

Ciampi, L., Fuentes, R., Schobitz, R., Bernal, G. and Oyarzun, J. 1998. Biological control of *Ralstonia solanacearum* : Alginate beads as carriers for antagonistic cells. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B2.

Devaux, A., D. Michelante, and M. Bicamumpaka. 1987. Combination of rotation and resistance to control bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in Rwanda. European Asepolation Potato Research X Triennial Conference Abstracts. P. 100-101.

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 acusative 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 Paper, P. 96.

Frenc, E.R., P. Aley. E. Torres, and U. Nydegger. 1993. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* in Peru and Brazil, In: Hartman, G.L. and A.C. Hayward (eds.) Bacterial wilt. Proceedings of an International conference held at Kaohsiung, Taiwan. 28-31 October 1992. ACIAR Proceedlings No. 45. Canberra, Sustralia. P. 70-77.

French, E.R., Anguiz, R. and Aley, P. 1997. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. *In*. Bacterial wilt : Molecular and Ecology aspects. Prior, P., Allen, C. and Elphinestone, J. (eds.) INRA edn., Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 381 – 385.

Frey, P., Prior, P., Marie, C., Kotoujansky, A., Trigalet, D.D. and Trigalet, 1994. Hrp-(sup) mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol*. 60 (9) 3175-3181.

Guo, J., Qi, H. and Li, S. 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to pepper bacteria wilt. Bacterial wilt newsletter. 17: 3.

Karuna, K., Khan, A.N.A. and Ravikumar, M.R. 1998. Potential of biocontrol agents in the management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B3.

Kelaniyangoda, D.B. 1998. Bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) management in potato and tomato using botanicals and chemicals. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B13.

Lloyd, A.B. 1976. Bacterial wilt in a coid-temperature climate of Australia. In: Planning conference and wordshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State University, Raleigh, NC. USA. P. 134-136.

Martin, C. and E.R. French 1985. Bacterial wilt of potato Technioal Information Builetin No. 13. CIP Lima Peru.

Mundundu, N. and N.W.B. Bouwe. 1984. Apercu Bur nos connals-sanoes actueles sur la bacteriose de la pomme de terre au Zaire et reduction du taux Infection par sesotion. In: La reacherche sur le fle'trissement bacterien ouse par *Pseudomonas solanacearum* on Afrique Centrale, PRAPAC-CIP, B.P. 73, Ruhengeri, Rwanda, P. 46-51.

Nesmith, W.C. and Jenkins, J.S.F. 1985. Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. Phytopathology 75 : 1182-1187.

Rueda, J.L. 1980. Seed potato improvement under bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) pressure: An Integrated approach. Ph.D. Thesis, University of Reading, U.K. 266 p.

Saneviratne, S.N. 1988. Soil survivel of *Pseudomonas solanacearum*. In: Bacterial disease of the potato. Report of the Planning onference on Bacterial Disease of the potato, Mrch, 15-20, 1987. Lima, Peru, CIP. Lima, Peru. P. 85-91.

Shekhawat, Q.S., S.K. Ohakrabarti, and A.V. Gadewar. 1992. Potato bacterial wilt In: India. Central Potato Research Institute-ICAR, Tech. Bull. 28. Shirrte, HP, India. 52 p.

Tans-Kersten, J., Huang, H. and Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*. 183 (12) 3597-3605.

Vander Zaag, P. 1986. Potato production under *Pseudomonas solanacearum* conditions. Sources and management of planting materials. In: Persley, G.J. (ed.) Bacterial wilt disease in Asia and South Pacific. ACIAR Proceedings 13, Canberra, Australia. P. 84-88.

การควบคุมโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศโดยชีววิธี

Biological control of tomato bacterial wilt

วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] บูรณี พั่ววงศ์แพทย์[1] สุรีย์พร บัวอาจ[1]
วิลาวัลย์ ใคร่ครวญ[2] ธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์[3]
1/ กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2/ ศูนย์วิจัยพืชสวนกาญจนบุรี
3/ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

บทคัดย่อ

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียมะเขือเทศ ในพื้นที่ปลูกภาคกลาง แยกเก็บเชื้อสาเหตุโรคได้ 4 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 11 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวจากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ได้เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ 9 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบต่อเชื้อปฏิปักษ์ที่เก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา พบว่ามีเชื้อที่มีคุณสมบัติปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลท ซึ่งจะได้นำเชื้อดังกล่าวใช้ทดสอบต่อไป

รหัสการทดลอง 07-01-49-06

คำนำ

มะเขือเทศ(tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lycopersicon esculentum* Mill. เป็นพืชที่นิยมปลูกกันมากเพราะสามารถบริโภคได้ทั้งผลสด ใช้ปรุงอาหารและผลิตในรูปอุตสาหกรรม พื้นที่ปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม 27,195 ไร่ มะเขือเทศรับประทานสด 28,209 ไร่ (พ.ศ..2540 / 2541)พันธุ์ที่ส่งเสริม มะเขือเทศอุตสาหกรรม พันธุ์เบต้า เดต้า TW 4 มะเขือเทศรับประทานสด พันธุ์สีดาทิพย์ ต้นทุนการผลิต/ไร่ 7,750 บาท/ไร่ (พ.ศ. 2542) มะเขือเทศสามารถขึ้นได้กับดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนที่มีความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของดินในช่วง 6.0-6.8 และความชื้นของดินพอเหมาะ ต้องการแสงแดดเต็มที่ตลอดวัน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ระหว่าง 21-24 องศาเซลเซียสปัญหาสำคัญในการปลูกมะเขือเทศได้แก่ ปัญหาเรื่องแมลงและโรค โรคที่สำคัญทำความเสียหายให้แก่การปลูกมะเขือเทศมากที่สุดได้แก่โรคเหี่ยวแบคทีเรีย (bacterial wilt) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Ralstonia solanacearum* พบระบาดในทุกแหล่งที่มีการปลูกมะเขือเทศ ซึ่งในพืช Solanaceae มะเขือเทศจะอ่อนแอต่อเชื้อนี้มากที่สุด เกิดและติดโรคได้ง่ายและดีที่สุด โรคระบาดได้เร็วและรุนแรง (วนิดา,2542) *R. solanacearum* เชื้อนี้เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของโลกโรคหนึ่ง เพราะสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ มากกว่า 200 ชนิด และที่สำคัญยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีพอ โดยเฉพาะการใช้สารเคมีไม่แนะนำให้ใช้ แนวทางในการควบคุมโรคนี้ต้องเน้นที่การป้องกัน เพราะเชื้อสาเหตุโรคนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง สามารถอยู่รอดในดินได้ (soil born disease) สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้เป็นอย่างดี สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์พืชได้ ในประเทศไทยโรคนี้เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น มะเขือต่าง ๆ พริกต่าง ๆ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง งาและยาสูบ เป็นต้น สำหรับการป้องกันกำจัด มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ (วงศ์, 2548) และจากการทดลองใช้วิธีผสมผสานวิธีการต่าง ๆ ร่วมกันในการควบคุมโรคพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์DOA-WB4 เพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด (วงศ์, 2549) และขยายผลการใช้เชื้อ DOA-WB4 ในแปลงเกษตรกร พบว่าได้ผลดี สามารถลดการเกิดโรคได้ 0-65 % (วงศ์, 2550) ถ้ามีการขยายผลการใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศทำนองเดียวกับงานวิจัยมันฝรั่งเพื่อหาเชื้อที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในมะเขือเทศเช่นเดียวกันกับที่ใช้ได้ผลในมันฝรั่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกมะเขือเทศอย่างมาก

ปัจจุบันการควบคุมโรคเหี่ยวที่ได้ผลดีคือการป้องกันการเกิดโรคซึ่งเป็นยุทธศาสตร์การควบคุมโรคในเชิงรับ แต่การใช้เชื้อปฏิปักษ์ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียที่นอกจากคุณสมบัติการเป็น

เชื้อปฏิปักษ์แล้วยังควรจะประกอบด้วยคุณสมบัติที่ได้เปรียบอื่น ๆ อีกเช่น มีความสามารถในการอยู่รอดในธรรมชาติได้ดีกว่าเชื้อสาเหตุโรค มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้กว้างขวางกว่าเชื้อสาเหตุของโรคและมีอัตรากาเจริญเติบโตที่สูงกว่าเชื้อสาเหตุโรค ด้วยเหตุผลที่เชื้อปฏิปักษ์ DOA-WB4 เป็นเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งเป็น flora micro organism สามารถพบได้ทุกแห่งทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นในอากาศ ในน้ำ ในดิน ซากพืชซากสัตว์ เชื้อนี้อยู่ในห่วงลูกโซ่อาหาร(food chain)ของระบบนิเวศทั่วไปในธรรมชาติ ซึ่งโดยธรรมชาติคุณสมบัติเหล่านี้ของเชื้อ *B. subtilis* จะได้เปรียบกว่าเชื้อ *R. solanacearum* จึงเป็นสิ่งที่ถูกนำมาใช้เป็นยุทธศาสตร์เชิงรุกของการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวในสภาพธรรมชาติ

โรคเหี่ยวเขียวที่พบในประเทศไทยเกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* 2 race คือ race 1 และrace 3 จากรายงานของ Martin C. 1985 พบว่า 90% ของเชื้อ *R. solanacearum* ที่พบในที่สูงเขตหนาว (cool-climate) เป็น race 3 biovar 2A ในพื้นที่ที่เป็นที่ราบ (Low land) เชื้อสาเหตุโรคที่พบในเขตนี้ส่วนมากจะเป็น race 1 biovar 1, 3, 4 และ 2T ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีพืชอาศัยค่อนข้างกว้าง โดยเฉพาะพืชในตระกูล Solanaceae วัชพืชหลายชนิดและพืชท้องถิ่น พบระบาดมากในเขตร้อนและกึ่งร้อน เช่นทางตอนใต้ของทวีปอเมริกาและเขตเอเชีย ซึ่งได้มีการใช้กลยุทธ์ที่สามารถควบคุมโรคได้อย่างได้ผลมาแล้ว (Frenon 1994) ดังตัวอย่างโรคเหี่ยวเขียวที่ระบาดในมันฝรั่งในเขตหนาวทางเหนือของ Dorrigo รัฐ New South Wales ประเทศออสเตรเลียในระหว่างปี 1990-1 ได้วางกลยุทธ์โดยปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อนี้หรือไถคืนปล่อยให้เป็นทุ่งหญ้านาน 2 ปีครึ่ง จากนั้นใช้หัวพันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรงมีคุณภาพดีและปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวจากการตรวจสอบด้วยมาตรการที่กวดขันเข้มงวดของฝ่ายกักกันพืช ทำให้สามารถปลูกมันฝรั่งในพื้นที่ดังกล่าวได้ผลดี (Lioyd 1976) ส่วนพันธุ์ที่ไม่ใช่พืชอาศัยได้แก่ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่างและถั่ว cowpea สามารถปลูกสลับกันประมาณ 8-10 เดือนจะลดการระบาดของโรคได้ หรือการตรวจเชื้อจากชุดตรวจสอบชนิดสำเร็จ Rs (CIP Kit) ช่วยให้การตรวจหาเชื้อที่ติดมากับหัวส่วนขยายพันธุ์ ดิน น้ำ ได้ถูกนำมาใช้ในหลาย ๆ ประเทศในทวีปอเมริกาใต้ เพื่อใช้คัดเลือกต้นพันธุ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Frenoh 1994, Mundundu Bouwe 1984 และ Reudu 1990) Nesmith and Jenkins (1985) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มักพบในดินที่มีอินทรีย์หมักตามธรรมชาติ (suppressive and conducive composed soil) Guo *et al*., (2002) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากพืช (rhizosphere bacteria) ได้แก่ *Pseudomonas* sp. J3, *Bacillus* spp. BB11 and FH 17 มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและผลิตสารปฏิชีวนะที่สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ Frey *et al*., (1994) ใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสร้างเชื้อกลายพันธุ์ของเชื้อโรคนี้ (Hrp$^-$ mutant of *R. solanacearum* by **ω**-Km interposon used genetically engineered) ช่วยลดการเกิดโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้

Aino *et al.,* (1998) รายงานว่า endophytic pseudomonads, FPT and FPH มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ Shiomi *et al.* (1999) พบว่าการใช้ suppressive soil จากเมือง Mutsumi ช่วยลดความรุนแรงของโรคดังกล่าวในมะเขือเทศ Ciampi *et al.,* (1999) ใช้สารสกัดจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ไอโซเลท A47 และ *Pseudomonas fluorescens* BC8 ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเหี่ยว สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพไร่ Sanaina *et al*., (1998) ใช้เชื้อแบคทีเรียบริเวณรากควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่งได้ 24-83 % และใช้ควบคุมได้ดีกว่าเชื้อโรคนี้ที่กลายพันธุ์เป็นเชื้อที่ไม่เกิดโรครุนแรง (avirulent mutant of *R. solanacearum*) ซึ่งจำแนกเป็น *Bacillus subtilis, B. cereus* และ *Enterobacter cloacae* Karuna *et al*., (1998) พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* สามารถควบคุมโรคนี้ได้ดีกว่า *Pseudomonas aeroginosa* Kelaniyangoda (1998) พบว่าการปรับปรุงดิน (soil amendment) ด้วยการผสม sun hemp seed (*Crotalaria juncea* L.) 10 t/ha + Calcium Oxide 2 t/ha + Urea 200 kg N/ha สามารถควบคุมโรคนี้ทั้งในมะเขือเทศและมันฝรั่ง Suthaya (1984) รายงานว่า *Bacillus cereus* และ *Pseudomonas fluorescens* ที่แยกเชื้อได้จากปุ๋ยหมักและปุ๋ยพืชสดสามารถยับยั้งการเจริญและการทำให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าวได้ แต่ไม่สามารถควบคุมโรคในสภาพไร่ Urutchata (1991) พบว่า *P. fluorescens* NA1 และ *Serratia marcescens* NA25 สามารถควบคุมโรคดังกล่าวในมะเขือเทศได้โดยการแช่รากของกล้ามะเขือเทศก่อนปลูก จากรายงานในประเทศไทยพบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R.solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง (วงศ์, 2548) ได้มีการพัฒนางานวิจัยการตรวจหาเชื้อ *R.solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่งด้วยชุดตรวจสำเร็จ ELISA KIT จากหัวพันธุ์มันฝรั่ง น้ำและดินที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ ทำให้สามารถตรวจเชื้อนี้ได้ (วงศ์, 2543; 2548) สารสกัดจากพลูและเปล้าน้อยสามารถลดการระบาดของโรคดังกล่าวได้ (วงศ์, 2540) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่น ๆ ที่สามารถใช้ในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ เช่น การปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่างของดิน การไถตากดิน การปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อนี้ การให้น้ำที่ไม่ส่งเสริมการแพร่ระบาดของเชื้อ การใช้เชื้อปฏิปักษ์ (antagonist) สามารถป้องกันและควบคุมโรคเหี่ยวในมันฝรั่ง (วงศ์, 2548) และจากรายงานความก้าวหน้าผลการทดลองการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งโดยวิธีผสมผสาน ผลการทดลองจาก 1 สถานที่ (location) พบเบื้องต้นว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์เพียงอย่างเดียวให้ผลในการควบคุมโรคดังกล่าวได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้วิธีการอื่น ๆ ร่วมด้วย (อยู่ในระหว่างตีพิมพ์) เป็นต้น

สำหรับโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียปัจจุบันเชื้อสาเหตุได้เปลี่ยนชื่อวิทยาศาสตร์เป็น *Ralstonia solanacearum* เชื้อนี้เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นโรคที่สำคัญมากที่สุดของโลกโรคหนึ่ง เพราะสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชต่าง ๆ

มากกว่า 200 ชนิด และที่สำคัญยังไม่มีวิธีการใดที่สามารถควบคุมโรคนี้ได้ผลดีพอ โดยเฉพาะการใช้สารเคมีไม่แนะนำให้ใช้ แนวทางในการควบคุมโรคนี้ต้องเน้นที่การป้องกัน เพราะเชื้อสาเหตุโรคนี้มีพืชอาศัยกว้างขวาง สามารถอยู่รอดในดินได้ (soil born disease) สามารถแพร่ระบาดไปกับน้ำได้เป็นอย่างดี สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์พืชได้ ในประเทศไทยโรคนี้เป็นโรคที่สำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เช่น พริกต่าง ๆ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา ถั่วลิสง มะเขือต่าง ๆ งาและยาสูบ เป็นต้น สำหรับการป้องกันกำจัด มีรายงานผลการทดลองที่ดำเนินการก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ (วงศ์, 2548) และจากการทดลองใช้วิธีผสมผสานวิธีการต่าง ๆ ร่วมกันในการควบคุมโรคพบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์DOA-WB4 เพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด (วงศ์, 2549) และขยายผลการใช้เชื้อ DOA-WB4 ในแปลงเกษตรกร พบว่าได้ผลดี สามารถลดการเกิดโรคได้ 0-65 % (วงศ์, 2550) ถ้ามีการขยายผลการใช้เชื้อปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกทำนองเดียวกับงานวิจัยมันฝรั่งโดยการแยกที่มีศักยภาพเป็นเชื้อปฏิปักษ์จากต้นที่ไม่เป็นโรคในที่ที่มีการระบาดของโรค คัดเลือกและทดสอบตามขบวนการทางวิชาการเพื่อหาเชื้อที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวในพริกเช่นเดียวกันกับที่ใช้ได้ผลในมันฝรั่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ปลูกพริกอย่างมาก

การทดลองจะเก็บตัวอย่างดินและรากพืชบริเวณ rhizoplane จากต้นปกติและต้นที่เป็นโรคในพื้นที่ที่เกิดโรคระบาด นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อในคลัง คัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว นำเชื้อไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในโรงเรือนทดลอง คัดเลือกเชื้อปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคในเรือนทดลองมาทดสอบในสภาพแปลงทดลองและแปลงเกษตรที่มีการระบาดของโรคโดยธรรมชาติ ตามลำดับ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างดินและรากจากต้นที่ไม่เป็นโรคในแปลงพริกที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวที่ เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จากแหล่งปลูกพริกของประเทศไทย

2. แยกเชื้อบริสุทธิ์และเก็บรักษาในคลังเชื้อห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป
3. ทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่คุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยว
4. นำเชื้อเชื้อที่คุณสมบัติเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคเหี่ยวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง
5. นำเชื้อที่คุณสมบัติสามารถควบคุมโรคเหี่ยวในโรงเรือนปลูกพืชทดลองไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในแปลงทดลอง
6. นำเชื้อที่คุณสมบัติสามารถควบคุมโรคเหี่ยวในในแปลงทดลองไปทดสอบการควบคุมโรคเหี่ยวในแปลเกษตรที่มีโรคดังกล่าวระบาด
7. เก็บ รวบรวม วิเคราะห์ข้อมูล การเกิดโรคและผลผลิต เขียนรายงาน

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บรวบรวมตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียมะเขือเทศ ในพื้นที่ปลูกภาคกลาง แยกเก็บเชื้อสาเหตุโรคได้ 4 ตัวอย่าง ได้ตัวอย่างโรคเหี่ยวแบคทีเรียของมะเขือเทศในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 11 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวจากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ได้เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ 9 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบต่อเชื้อปฏิปักษ์ที่เก็บรักษาไว้ที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา พบว่ามีเชื้อที่มีคุณสมบัติปฏิปักษ์ 9 ไอโซเลท ซึ่งจะได้นำเชื้อดังกล่าวใช้ทดสอบต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

(อยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง)

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตตรา เอี่ยมวิจิตร 2540. การศึกษาสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2540 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 11 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุลและรุ่งนภา คงสุวรรณ์ 2546. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* จากน้ำและดินในเขตชลประทานพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2546 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtillis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, ปิยรัตน์ รรมกิจวัฒน์ รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวิวัฒน์ ภานุอำไพ 2549. การควบคุมเชื้อ *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* Ehrenberg *วารสารวิชาการเกษตร* ปีที่ 24 ฉบับที่ 2 หน้า 178-197.

วงศ์ บุญสืบสกุล 2550 การควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง น.ส.พ. กสิกร (ISSN 0125-3697) ปีที่ 80 ฉบับที่4 หน้า 68-92.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตรา ภาวิจิตร 2540. การผลิตแอนติเซรัมที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 254 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 15 หน้า.

Aino, M., Maekawa, Y., Mayama, S and Kato, H. 1998. The use of endophytic bacteria in biocontrol. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number 2.10.5s.

Asplras, R.B. and A.R. de le Cruz. 1986. Potential biological control of bacterial with in tomato and potato with Bacillus polymyxa FUB and *Pseudomonas fluorescens.* In:Persley, G.J. (ed.). Bacterial wilt disease in Asia and the south Pacific. ACIAR Proceedings 13, Canberra, Australia. P. 69-92.

Ciampi, L., Fuentes, R., Schobitz, R., Bernal, G. and Oyarzun, J. 1998. Biological control of *Ralstonia solanacearum* : Alginate beads as carriers for antagonistic cells. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B2.

Devaux, A., D. Michelante, and M. Bicamumpaka. 1987. Combination of rotation and resistance to control bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*) in Rwanda. European Asepolation Potato Research X Triennial Conference Abstracts. P. 100-101.

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 acusative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, U.K. 288 p.

French, E.R., Anguiz, R. and Aley, P. 1997. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. *In*. Bacterial wilt : Molecular and Ecology aspects. Prior, P., Allen, C. and Elphinestone, J. (eds.) INRA edn., Springer Verlag, Berlin, Germany. pp. 381 – 385.

Frey, P., Prior, P., Marie, C., Kotoujansky, A., Trigalet, D.D. and Trigalet, 1994. Hrp-(sup) mutants of *Pseudomonas solanacearum* as potential biocontrol agents of tomato bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol*. 60 (9) 3175-3181.

Guo, J., Qi, H. and Li, S. 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to pepper bacteria wilt. Bacterial wilt newsletter. 17: 3.

Karuna, K., Khan, A.N.A. and Ravikumar, M.R. 1998. Potential of biocontrol agents in the management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. *In* : The proceeding of second bacterialwilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper no. B3.

Kelaniyangoda, D.B. 1998. Bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) management in potato and tomato using botanicals and chemicals. *In* : The proceeding of second bacterial wilt international symposium. 22-27 June 1997. Quadeloupe, French West Indies. paper number B13.

Lloyd, A.B. 1976. Bacterial wilt in a coid-temperature climate of Australia. In: Planning conference and wordshop on the ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. North Carolina State University, Raleigh, NC. USA. P. 134-136.

Martin, C. and E.R. French 1985. Bacterial wilt of potato Technioal Information Builetin No. 13.CIP Lima Peru.

Nesmith, W.C. and Jenkins, J.S.F. 1985. Influence of antagonists and controlled matrix potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. Phytopathology 75 : 1182-1187.

Saneviratne, S.N. 1988. Soil survivel of *Pseudomonas solanacearum*. In: Bacterial disease of the potato. Report of the Planning onference on Bacterial Disease of the potato, Mrch, 15-20, 1987. Lima,Peru, CIP. Lima, Peru. P. 85-91.

Tans-Kersten, J., Huang, H. and Allen, C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of Bacteriology*. 183 (12) 3597-3605.

Vander Zaag, P. 1986. Potato production under *Pseudomonas solanacearum* conditions. Sources and management of planting materials. In: Persley, G.J. (ed.) Bacterial wilt disease in Asia and South Pacific. ACIAR Proceedings 13, Canberra, Australia. P. 84-88.

Wong Boonsuesakul *et al.*2003. Using of biovar type system and host specific pathogenicity to grouping of The bacterial caused bacterial wilt disease of economic crops in Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*. 36 (2) : 173-184.

Wong Boonsuesakul *et al.*2005. Study on rapid and easy differentiation of *Bacillus* spp. With Thin-Layer Chromatogram for amino-lipid. *Thai Phytopathology*. 19 (1-2) :1-12.

Wong Boonsuebsakul *et al*. 2006. Controlling of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al*., a causal agent of potato bacterial wilt by *Bacillus subtilis* Ehrenberg. Thai Agricultural Research Journal. 24 (2): 178-197

การทดสอบเทคโนโลยีการใช้ชีวินทรีย์ในการควบคุมโรครากปมในแปลงสาธิต

Microorganism Application Technology for Controlling Root Gall Disease on Demonstration Plot

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ธารทิพย ภาสบุตร
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปม โดยทำการทดสอบวิธีการใช้ราปฏิปักษ์ในสภาพแปลงปลูกพริกของเกษตรกรในพื้นที่ จ. กาญจนบุรี ในสภาพต้นกล้าพริกอายุ 30 วัน ที่มีไส้เดือนฝอย *M. incognita* เข้าทำลาย โดยนำราปฏิปักษ์ที่เพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างอัตรา 500 กรัม/พื้นที่แปลงทดลองขนาด 1x5 เซนติเมตร รองก้นหลุมก่อนปลูกกล้าพริกและโรยรอบโคนต้น มีจำนวนการใช้ราปฏิปักษ์ โดยวิธีใส่ 1 2 และ 4 ครั้ง เปรียบเทียบกับไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (control) เมื่อวัดดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากพริกที่อายุเก็บเกี่ยวหรือประมาณ 3 เดือน ผลการทดสอบพบว่า การใช้ราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ที่ 2 และ 4 ครั้ง มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* สามารถลดการเกิดปมได้ 50-75 % ของระบบราก หรือมีดัชนีการเกิดปมที่ระบบราก 2.85 และ 2.54 ตามลำดับ ในขณะที่การใส่ 1 ครั้ง และไม่ใส่ราปฏิปักษ์มีดัชนีการเกิดปมที่รากพริกเท่ากับ 3.54 และ 4.90

รหัสโครงการวิจัย 0701490606030151

คำนำ

การศึกษาการใช้จุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีมากกว่า 500 เรื่อง (Kerry, 1987) เป็นเรื่องเชื้อราใช้กับดักหรือห่วงดัก 57 % เชื้อราที่เป็น endoparasite 19 % แบคทีเรีย 5 % โปรโตซัว 3 % rickettsia 2 % tardigrade <1 % virus <1 % ไส้เดือนฝอย 7 % ไรต่างๆ 2 % collemmbola 1 % enchytrid < 1 % turbellarian < 1 % แมลงชนิดอื่นๆ < 1 % จะเห็นได้ว่าเชื้อราได้มีการศึกษากันมากที่สุดรวม 76% เชื้อราที่มีการศึกษากันมากได้แก่ เชื้อรา *Paecilomyces lilacinus, P. nostocoides และ Acremonium* spp. เป็นต้น

โดย Jatala (1985; 1986) เป็นบุคคลแรกที่พบว่ารา *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson สามารถใช้ป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne spp.* ได้ดี ซึ่งพบว่าราชนิดนี้สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชได้หลายชนิดรวมทั้งไส้เดือนฝอยรากปมและ cyst nematodes

Dunn (1983) สามารถแยกได้เชื้อรา *P. nostocoides* จาก cyst ของไส้เดือนฝอย *Heterodera zeae* แต่เนื่องจากมีรูปร่างลักษณะทางสัณฐานและโครงสร้างใกล้เคียงกับเชื้อรา *P. lilacinus* มาก Godoy *et al.* (1983) พิจารณาเห็นว่าเป็นสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจากเชื้อรา *P. lilacinus*

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า *P. lilacinus* ที่แยกได้จาก isolate ต่างๆ มีความแตกต่างกันในความสามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอย บาง isolate ไม่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้ (Dunn *et al.,* 1982) ส่วนการใช้เชื้อราชนิดนี้ในสภาพไร่นั้นบางครั้งก็ไม่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อราอยู่เป็นจำนวนมาก (Hewett *et al*., 1988) จึงเห็นได้ชัดว่าจำเป็นจะต้องมีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวเชื้อราอีกมาก รวมทั้งปฏิกิริยาระหว่างเชื้อรากับไส้เดือนฝอย การอยู่รอดของเชื้อราอาจอยู่ในรูปของการใช้อินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดินหรือในรูปของการเป็นพาราสิตกับไส้เดือนฝอย ปริมาณและคุณภาพของอินทรียวัตถุที่มีอยู่ในดิน การแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นๆ สิ่งเหล่านี้อาจมีอิทธิพลต่อการเป็นพาราสิตต่อไส้เดือนฝอย (Stering, 1991)

ในปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราที่แยกได้จากดินหลายชนิด มาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ได้แก่ รา *Paecilomyces lilacinus* เข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอย *Meloidogyne incognita* และ *M. hapla* ในมะเขือเทศ และยังเพิ่มผลผลิตของมะเขือเทศอีกด้วย (Sikora, 1992) รา *Arthrobotrys dactyloides* และ *A. brochopaga* สร้าง ring traps รัดรอบๆ ลำตัวของไส้เดือนฝอย *A. oligospora* สร้างตาข่ายเหนียว (sticky nets) รา *Dactylaria haptotyla* และ *Nematoctonus* spp. สร้าง sticky knobs รา *Drechmeria coniospora* และ *Hirsutella rhossiliensis* สร้างสปอร์เหนียว ซึ่งราแต่ละชนิดจะสร้างกับดักและสร้างเส้นใยเข้าไปเจริญในตัว

ไส้เดือนฝอยและไส้เดือนฝอยจะตายในที่สุด นอกจากนั้นยังมีราไมคอร์ไรซา ได้แก่ เวสิคูลาร์ อาร์บัสคูลาร์ ไมคอร์ไรซา (วี-เอไมคอร์ไรซา) ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยอยู่ร่วมกับรากพืช โดยมีความสัมพันธ์แบบอำนวยประโยชน์ซึ่งกันและกัน สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตให้แก่พืช โดยช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและลดการใช้ปุ๋ย ช่วยเพิ่มปริมาณการดูดธาตุฟอสฟอรัส ไนโตรเจน และจุลธาตุอาหารให้มากขึ้น (Jackson *et al*., 2002; Nikitas *et al*., 2002; Bagyaraj, 1992) และยังช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยในดินที่มีฟอสฟอรัสน้อย (มลชัย, 2541) เชื้อราวี-เอไมคอร์ไรซา สามารถลดปริมาณความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศอย่างมีนัยสำคัญ และยังมีรายงานการลดความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยกับผักชนิดอื่นๆ ด้วย (Sikora and Schonbeck, 1995)

จากการสืบค้นข้อมูลจุลินทรีย์ที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย มีรายงานผลงานวิจัยโดย สืบศักดิ์ (2533) รายงานว่ามีเชื้อรามากกว่า 400 ชนิดใน 15 สกุล ที่สามารถเข้าทำลายไส้เดือนฝอยได้

ศรศิลป์ (2536) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับเชื้อราที่สามารถใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยได้มีจำนวน 33 สกุลด้วยกัน ในจำนวนนี้มีเชื้อราสกุล *Paecilomyces* รวมอยู่ด้วย

มนตรี (2538) ได้ศึกษาการใช้เชื้อราร่วมกับแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปม โดยใช้เชื้อราองก้นหลุมก่อนปลูกแง่งขิงที่มีไส้เดือนฝอยรากปมสามารถลดปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมลงและให้ผลผลิตใกล้เคียงกับวิธีการใช้สารเคมี oxamyl จุ่มขิงก่อนปลูก

ในด้านการแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Paecilomyces* ได้มีการศึกษา การแยกเชื้อราจากดินที่นิยมใช้คือวิธี dilution plate (เลขา, 2533; จิรเดช, 2536) สำหรับการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อรามีการใช้วัสดุหลายชนิดโดยมากจะใช้เมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวบาเลย์ ข้าวโพด ข้าวเจ้าและข้าวฟ่าง ในประเทศไทย สุภกิจ (2532) และศรศิลป์ (2536) ใช้เมล็ดข้าวฟ่างเป็นวัสดุในการเพิ่มปริมาณเชื้อราและได้ผลดี

โรครากปมที่มีสาเหตุจากไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. ทำความเสียหายให้กับพืชผักเกือบทุกชนิดและมีการแพร่ระบาดในทุกภูมิภาคของประเทศไทย วิธีการควบคุมและป้องกันกำจัดโรครากปมต้องปฏิบัติก่อนการปลูกพืช เกษตรกรไม่สามารถกำจัดไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมในขณะพืชเป็นโรคได้ จากการนำรา *Paecilomyces lilacinus* มาใช้ควบคุมโรครากปมในระดับโรงเรือนและสภาพไร่พบว่า สามารถควบคุมโรครากปมได้ จากรายงานของ นุชนารถ และ อำนวย (2550) พบว่า การปลูกปอเทืองถึงระยะออกดอกและไถกลบก่อนปลูกกระเจี๊ยบเขียว มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* spp. สามารถลดการเกิดปมได้มากกว่า 75 % ของระบบราก และการปลูกถั่วลิสงและทำการไถกลบก่อนปลูกและวิธีใช้พลาสติกคลุมดิน 1 เดือน ก่อนปลูกกระเจี๊ยบเขียว ลดการเกิดปมได้ 25-50 % ของระบบราก อย่างไรก็ตาม เกษตรกร

ไม่สามารถกำจัดไส้เดือนฝอยสาเหตุโรครากปมในขณะพืชเป็นโรคได้ จากการนำรา *Paecilomyces lilacinus* และไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Mononchus* มาใช้ควบคุมโรครากปมในระดับโรงเรือนพบว่า สามารถควบคุมโรครากปมได้ ดังนั้น การนำเชื้อรา *P. lilacinus* ที่แยกได้ในประเทศไทยมาใช้ควบคุมโรครากปมในพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงควรทำการศึกษาวิธีการใช้รา *P. lilacinus* ที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในแปลงของเกษตรกรที่มีปัญหาของโรครากปม เพื่อได้เป็นแปลงสาธิตและการทดสอบเทคโนโลยีการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอยรากปมโดยชีววิธี ซึ่งจะเป็นแนวทางการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีที่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และสภาพแวดล้อม ตลอดจนเพิ่มทางเลือกและการยอมรับของเกษตรกรในการควบคุมโรครากปมต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการควบคุมโรครากปมในแปลงเกษตรกร

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus*
2. ไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne incognita*)
3. เมล็ดพันธุ์พริกกระเหรี่ยง
4. สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และเครื่องแก้วสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. เลือกพื้นที่ทดลองที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม และเตรียมแปลงขนาด 1x5 เมตร จำนวน 16 แปลงย่อย
2. เตรียมกล้าพริกกระเหรี่ยงอายุ 30 วัน จำนวน 320 ต้น ใช้ปลูก 20 ต้น/แปลงย่อย
3. เตรียมราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ ตามเทคนิคของธารทิพย และนุชนารถ (2550) น้ำหนัก 500 กรัม/แปลงย่อย
4. ปฏิบัติตามแผนการทดลอง แบบ RCB มี 4 กรรมวิธี 4 ซ้ำ กรรมวิธีประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ใส่รา *P. lilacinus* อัตรา 500 กรัม/แปลงย่อย พร้อมปลูก

กรรมวิธีที่ 2 ใส่รา *P. lilacinus* อัตรา 500 กรัม/แปลงย่อย พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 เดือน

กรรมวิธีที่ 3 ใส่รา *P. lilacinus* อัตรา 500 กรัม/แปลงย่อย พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 2 และ 3 เดือน

กรรมวิธีที่ 4 ไม่ใส่ราปฏิปักษ์ (inoculated control)

การบันทึกข้อมูล

- วัดดัชนีการเกิดปมที่ราก ตามวิธีของนุชนารถ และวราภรณ์ (2550) ดัดแปลงตามวิธีของ Hussey and Jansaen (2001) แบ่งเป็น 5 ระดับดังนี้ :- 0 = ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย; 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%; 3 = เกิดปม 25-50%; 4 = เกิดปม 50-75%; และ 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2552

สถานที่ดำเนินการ แปลงเกษตรกร จ.กาญจนบุรี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* อัตรา 500 กรัม/พื้นปลูก 5 ตารางเมตร ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมในพริกขี้หนูพันธุ์กระเหรี่ยง ในแปลงปลูกของเกษตรกร จ.กาญจนบุรี ผลการทดสอบพบว่าระบบรากพริกที่อายุเก็บเกี่ยวในกรรมวิธีที่ใส่ราปฏิปักษ์พร้อมปลูกและใส่หลังพริกอายุ 1 เดือน (ใส่ 2 ครั้ง) มีดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ใส่ราปฏิปักษ์พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 2 และ 3 เดือน (4 ครั้ง) เท่ากับ 2.85 และ 2.54 หรือมีดัชนีการเกิดปมเท่ากับระดับ 3 (3 = เกิดปมน้อยกว่า 25-50 %) ตามลำดับ ช่วยลดการเกิดปมที่ระบบรากพริกเท่ากับ 50-75 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ราปฏิปักษ์ 1 ครั้ง และไม่ใส่ราปฏิปักษ์ พบว่าระบบรากมีดัชนีการเกิดปมเท่ากับ 3.54 และ 4.90 หรือเกิดปมเท่ากับระดับ 4 (4= เกิดปม 50-75%) และ 5 (5 = เกิดปม > 75%) ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองแสดงถึงการใช้ราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ในอัตราที่สูงขึ้นมีผลทำให้ลดประชากรไส้เดือนฝอยรากปมในดินลดลง เป็นผลจากราเข้าทำลายไข่ของไส้เดือนฝอยทำให้ไข่ถูกทำลายไม่สามารถฟักเป็นตัวอ่อนเข้าทำลายรากพืชต่อเนื่องได้

ตารางที่ 1 ดัชนีการเกิดปมที่ระบบรากเมื่อมีการใช้ราปฏิปักษ์ *Paecilomyces lilacinus* ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* สาเหตุของโรครากปมพริกในสภาพไร่

กรรมวิธี	ดัชนีการเกิดปมที่ราก[1/]
1. ใส่ราปฏิปักษ์อัตรา 500 กรัม/แปลง พร้อมปลูก	3.54 b[2/]
2. ใส่ราปฏิปักษ์อัตรา 500 กรัม/แปลง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 เดือน	2.85 c
3. ใส่ราปฏิปักษ์อัตรา 500 กรัม/แปลง พร้อมปลูก และใส่หลังปลูก 1 2 และ 3 เดือน	2.54 c
4. ไม่ใส่ราปฏิปักษ์และใส่ไส้เดือนฝอย (inoculated control)	4.90 a
CV. (%)	6.24

[1/]0 = ไม่มีปม; 1 = มีปมเกิดขึ้นเล็กน้อย; 2 = เกิดปมน้อยกว่า 25%; 3 = เกิดปม 25-50%; 4 = เกิดปม 50-75%; และ 5 = เกิดปมมากกว่า 75% ของระบบราก

[2/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธีในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% คำนวณโดยการใช้วิธี DMRT

อย่างไรก็ตาม การนำราปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยสาเหตุของโรครากปม ต้องคำนึงถึงอัตราการใช้และรูปแบบของการใช้ รวมถึงต้นทุนการผลิตราปฏิปักษ์เหล่านั้น คุ้มค่ากับการนำมาใช้ประโยชน์หรือไม่ ตลอดจนการยอมรับของเกษตรกรเป็นสำคัญ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การใช้ราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ที่อัตรา 500 กรัม/พื้นที่ 5 ตารางเมตร รองก้นหลุมก่อนปลูกและใส่อีก 1-3 ครั้ง หรือเมื่อพืชอายุ 1 2 และ 3 เดือน มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *M. incognita* สาเหตุของโรครากปมในพริก สามารถลดการเกิดปมได้ 50-75 % ของระบบราก ผลของวิจัยสามารถแนะนำเกษตรกรใช้รา *P. lilacinus* ควบคุมโรครากปมในแปลงปลูกพริก และพัฒนากระบวนการผลิตขยายราปฏิปักษ์ให้เป็นวิธีง่ายๆ เกษตรกรสามารถเรียนรู้และเพาะเลี้ยงใช้เองได้ ซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตและปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. พัฒนากระบวนการผลิตราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ให้เป็นวิธีการขยายปริมาณอย่างง่ายๆ ต้นทุนต่ำ เกษตรกรสามารถนำไปทำใช้เองได้

2. ถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ราปฏิปักษ์ *P. lilacinus* ไปยังหน่วยงานในส่วนภูมิภาคนำไปแนะนำเกษตรกรในพื้นที่ที่ประสบปัญหาโรครากปม

เอกสารอ้างอิง

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2536. บทปฏิบัติการวิชานิเวศน์วิทยาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 77 น.

ธารทิพย ภาสบุตร และ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2550. เทคนิคการขยายปริมาณเชื้อราในเมล็ดธัญพืช. ใน : รายงานผลงานวิจัย บทคัดย่อ/รายงานความก้าวหน้า ปี 2550. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วราภรณ์ ประกอบ. 2550. เทคนิคการคัดเลือกและประเมินพันธุ์พริกต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม. วารสารอารักขาพืช 2 (1-2) : 31-40.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ อำนวย อรรถรังรอง. 2549. การควบคุมโรครากปมในกระเจี๊ยบเขียวโดยวิธีเขตกรรม. ใน : รายงานผลงานวิจัย บทคัดย่อ/รายงานความก้าวหน้า ปี 2549. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2538. ผลของสารเคมีและเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* ในแง่งพันธ์ขิง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เลขา มาโนช. 2533. บทปฏิบัติการราในน้ำและในดิน. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 140 น.

ศรศิลป์ บุญบันดาล. 2536. การแพร่กระจายและการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดในพื้นที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2533. หลักการควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช 10(3-4) : 47.

สุภกิจ สุขใจมิตร. 2532. อิทธิพลของ antagonist plants และเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* ต่อไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Bagyaraj, D.J. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhiza. Application in Agriculture. Methods Microbiol. 24 : 360-373.

Dunn, M. T. 1983. *Paecilomyces nostocoides,* a new hypomycete isolated from cysts of *Heterodera zeae.* Mycologia 75 : 179-182.

Dunn, M.T., Sayre, R.M., Carell, A. & Wergin, W.P. 1982. Colonization of Nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom)Samson as observed with scanning electron microscope. Scanning Electron Microscopy 3 : 1351-1357.

Hewett, T.E., D.W. Dickson, D.J. Mitchell and M.E. Kannwischer-Mitchell. 1988. Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* as a biocontrol agent of *Meloidogyne javanica* on tobacco. Journal of Nematology 20 : 578-584.

Jackson, L.E., D. Miller and S.E. Smith. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of wild and cultivated lettuce in response to nitrogen and phosphorus. Scientia Horticulturae 94 : 205-218.

Jatala, P. 1985. Biological control of nematode, pp. 303-308. *In* J. N. Sasser and C.C. Carter (eds.). An Advanced Treatise on *Meloidogyne* Volume II : Biology and Control. North Carolina State Univ. Graphics, Raleigh, North Carolina.

Jatala, P., 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology 24 : 453-489.

Kerry, B.R. 1987. Biological Control. pp. 233-263. *In* R.H. Brown and B.R. Kerry. (eds.). Principle and Practice of Nematode Control in Crop. Academic Press, Sydney.

Nikitas, K., B. Fotios and S. Nikolaos. 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. Scientia Horticulturae 94 : 145-156.

Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystemes for the control of plant parasitric nematodes. Annual Review of Phytopathology 12 : 245-270.

Sikora, R.A. and F. Schonbeck. 1995. Effect of vesicular-mycorrhizae, *Endogone mosseae* on the population dynamics of the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla,* pp. 158-166. *In* proceedings VIII International Congress Plant Protection, Moscow.

Sterring, G.R. 1991. Biological control of Plant Parasitic Nematode: Progress, Problem and Prospect. C.A.B. International, UK. 282 p.

ศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชส่งออก (หน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา) และพืชนำเข้า (พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ)

Study on the Species of Insect Pests of Exported Crops (Asparagus and Garden Pea) and Imported Crops (*Cucumis* spp. and *Brassica* spp.)

ศิริณี พูนไชยศรี ชลิดา อุณหวุฒิ ลักขณา บำรุงศรี ยุวรินทร์ บุญทบ
สุนัดดา เชาวลิต ณัฐวัฒน์ แย้มยิ้ม สิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักพืช

บทคัดย่อ

โดยการสำรวจรวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูพืชทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจากพืชส่งออกและนำเข้า 4 พืช ได้แก่ พืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา ส่วนพืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ พืชตระกูลแตง และพืชตระกูลกะหล่ำ จากแหล่งปลูกพืชดังกล่าวทั่วประเทศ ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2552 นำตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ชนิดตามหลักอนุกรมวิธาน รวมทั้งตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของแมลงศัตรูพืชทั้งหมดที่ได้ศึกษา พบแมลงศัตรูพืชดังต่อไปนี้ พืชส่งออก: **หน่อไม้ฝรั่ง** พบแมลงศัตรู อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 5 ชนิด **ถั่วลันเตา** พบแมลงศัตรู 3 อันดับ 4 วงศ์ 6 ชนิด ได้แก่ อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 3 ชนิด อันดับ Homoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และ อันดับ Lepidoptera 2 วงศ์ 2 ชนิด ส่วนพืชนำเข้า: **พืชตระกูลแตง** พบแมลงศัตรู 3 อันดับ 3 วงศ์ 5 ชนิด ได้แก่ อันดับ Homoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 2 ชนิด และอันดับ Coleoptera 1 วงศ์ 2 ชนิด **พืชตระกูลกะหล่ำ** พบแมลงศัตรู 3 อันดับ 5 วงศ์ 8 ชนิด ได้แก่ อันดับ Homoptera 1 วงศ์ 2 ชนิด อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และอันดับ Lepidoptera 3 วงศ์ 5 ชนิด ได้จัดทำรายละเอียดชนิดของศัตรูพืช รวมทั้งส่วนของพืชที่ถูกทำลายไว้อย่างสมบูรณ์

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม รายได้จากการส่งออกของประเทศ ส่วนใหญ่มาจากสินค้าเกษตร เช่น ไม้ดอก พืชผักและไม้ผล จากการเปิดเสรีทางการค้าทำให้ประเทศไทยในฐานะประเทศสมาชิกองค์การค้าโลก (World Trade Organization) ต้องปฏิบัติตามกฎเกณฑ์เกี่ยวกับการค้าสินค้าเกษตร ภายใต้ความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการด้านสุขอนามัย และสุขอนามัย

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-01-01-51

พืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary Measure หรือ SPS) ซึ่งระบุไว้ชัดเจนว่า ประเทศสมาชิกมีสิทธิ์และพันธกรณีพื้นฐาน (right and obligation) ในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชจากต่างประเทศ มิให้เข้าไปเป็นอันตรายหรือเกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืชและสิ่งแวดล้อม (อรุณี,2543) วิธีการปฏิบัติคือประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืช โดยวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) อาจจะเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และวัชพืช ชนิดใดชนิดหนึ่ง ที่ติดมากับสินค้าเกษตรที่นำเข้า โดยที่ประเทศผู้นำเข้าจะต้องมีการขอบัญชีรายชื่อศัตรูพืช และข้อมูลด้านศัตรูพืช แต่ละชนิดของสินค้าเกษตรนั้นๆ ซึ่งประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรจะต้องเป็นผู้จัดทำ หากประเทศผู้ส่งออกไม่มีบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและข้อมูลศัตรูพืชที่พร้อม หรือครบถ้วนตามความต้องการของผู้นำเข้า ทำให้ประเทศผู้นำเข้าไม่มีข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช นำไปสู่การถูกกีดกันทางการค้าโดยจะไม่ได้รับอนุญาตให้นำเข้าสินค้าเกษตรนั้น

การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชส่งออก (หน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา) มีความจำเป็นต้องเร่งดำเนินการเพื่อเตรียมข้อมูลให้พร้อมสำหรับประเทศคู่ค้านำไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าพืชดังกล่าวจากประเทศไทย ส่วนพืชนำเข้า (พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ) ก็ต้องเร่งดำเนินการเช่นกัน ทั้งนี้เพื่อเตรียมพร้อมข้อมูลไว้สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อที่ประเทศคู่ค้าส่งมา ซึ่งนำไปสู่การวิเคราะห์ความเสี่ยงที่รวดเร็วขึ้น งานวิจัยครั้งนี้นอกจากต้องการทราบชนิดของแมลงศัตรูแล้ว ต้องมีการตรวจสอบรายชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันพร้อมกับการเก็บรวบรวมตัวอย่างของจริงไว้ในพิพิธภัณฑ์ เพื่อการยืนยัน ตรวจสอบ และอ้างอิง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างแมลงศัตรูพืช อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สวิงจับแมลง ปากคีบ พู่กัน กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก กล่องรักษาความเย็น ขวดฆ่าแมลง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ขวดดองแมลง สารเคมีต่างๆ เช่น สารเอททิลอะซิเตท แอลกอฮอล์ 70-80% AGA (น้ำยาเก็บตัวอย่าเพลี้ยไฟ) อุปกรณ์ที่ใช้จัดรูปร่างแมลง โดยวิธีการอบแห้ง ได้แก่ เข็มปักแมลง ไม้จัดรูปร่างแมลง (setting board) ปากคีบ ตู้อบแมลง อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสไลด์ถาวร ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น แอลกอฮอล์ 60-100% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไซลีน โคลฟออย แคนาดาบัลซัม บีคเกอร์ เตาไฟฟ้า แผ่นสไลด์แก้ว แผ่นแก้วปิดสไลด์ กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope

วิธีการ

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของแมลงศัตรูพืชของทั้ง 4 พืช จากเอกสารที่มีรายงานเกี่ยวกับแมลงศัตรูพืชทั้งในและต่างประเทศ ดำเนินการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างแมลงศัตรูพืชส่งออก 2 พืช ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง และถั่วลันเตา ส่วนพืชนำเข้า 2 พืช ได้แก่ พืชตระกูลแตง และพืชตระกูลกะหล่ำ จากแหล่งปลูกพืชดังกล่าว โดยใช้สวิงโฉบ / เคาะหรือเขย่ากิ่ง ต้น หรือดอกของพืชเพื่อให้แมลงศัตรูพืชตกลงบนอุปกรณ์ที่รองรับ หรือตัดใบ / กิ่ง / ยอดของพืชที่มีแมลงศัตรูพืชเกาะอาศัยด้วยกรรไกรตัดกิ่ง ใช้พู่กันเขี่ยแมลงศัตรูพืชที่พบใส่ขวดที่บรรจุน้ำยาดอง หรือนำตัวอย่างแมลงศัตรูพืชพร้อมพืชใส่ถุงพลาสติก กล่องพลาสติก หรือถุงกระดาษ เก็บตัวอย่างดังกล่าวในกล่องรักษาความเย็น ภายในบรรจุน้ำแข็งแห้งเพื่อรักษาตัวอย่างให้สดอยู่เสมอ หากตัวอย่างที่รวบรวมได้อยู่ในระยะตัวอ่อน เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยอ่อน หนอนผีเสื้อ หนอนแมลงวันผลไม้ ฯลฯ ต้องนำตัวอย่างไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนเป็นตัวเต็มวัย บันทึกรายละเอียดของแมลงศัตรูพืช และข้อมูลอื่นที่สำคัญ ได้แก่ ชนิดของพืช ส่วนของพืชที่พบตัวอย่าง ลักษณะการทำลาย วัน / เดือน / ปี สถานที่ และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งบันทึกโดยการถ่ายภาพ นำตัวอย่างที่บันทึกรายละเอียดไปจัดเตรียมตัวอย่างแมลง เพื่อวิเคราะห์ชนิดโดยการจัดรูปร่าง หรือทำสไลด์ถาวรและอบให้แห้ง นำตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ชนิด โดยตรวจสอบลักษณะที่สำคัญทางอนุกรมวิธานใต้กล้องจุลทรรศน์ และใช้เอกสารแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงศัตรูพืชและเอกสารรายงานถึงชนิดศัตรูพืชที่พบในประเทศไทยจาก CABI (2003), CABI (2007), Flint (1991), Pholboon (1965) และ Wongsiri (1991) ประกอบการเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง จัดทำป้ายและบันทึกข้อมูลรายละเอียดบนป้ายบันทึกกำกับตัวอย่างแมลง ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ พืชอาหาร วัน / เดือน / ปี สถานที่และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง รวมทั้งวัน / เดือน / ปี และชื่อผู้วิเคราะห์ชนิด นำตัวอย่างแมลงศัตรูพืชที่ได้ศึกษาวิจัยทั้งหมด เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์แมลง โดยแบ่งเป็นหมวดหมู่ตามระบบสากลของพิพิธภัณฑ์สิ่งสำคัญของการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีตัวอย่างจริงของแมลงศัตรูพืชทุกชนิดที่ได้รายงาน เก็บรักษาไว้เพื่อการตรวจสอบ / สืบค้น / อ้างอิง

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2550 ถึง เดือนกันยายน 2552

สถานที่ 1. แปลงปลูก หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ทุกภาคของประเทศ

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออก ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2552 ในพืชส่งออก 2 พืช คือ หน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา และในพืชนำเข้า 2 พืช คือ พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ โดยสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลง จากแหล่งปลูกพืชดังกล่าวทั่วประเทศ นำตัวอย่างมาศึกษาทางอนุกรมวิธาน โดยตรวจวิเคราะห์ชนิดและตรวจสอบชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องและเป็นปัจจุบันของแมลงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออก พบแมลงศัตรูพืชดังต่อไปนี้

พืชส่งออก

หน่อไม้ฝรั่ง พบแมลงศัตรู อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 5 ชนิด

ถั่วลันเตา พบแมลงศัตรู 3 อันดับ 4 วงศ์ 6 ชนิด ได้แก่อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 3 ชนิด อันดับ Homoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และอันดับ Lepidoptera 2 วงศ์ 2 ชนิด

พืชนำเข้า

พืชตระกูลแตง พบแมลงศัตรู 3 อันดับ 3 วงศ์ 5 ชนิด ได้แก่ อันดับ Homoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 2 ชนิด และอันดับ Coleoptera 1 วงศ์ 2 ชนิด

พืชตระกูลกะหล่ำ พบแมลงศัตรู 3 อันดับ 5 วงศ์ 8 ชนิด ได้แก่อันดับ Homoptera 1 วงศ์ 2 ชนิด อันดับ Thysanoptera 1 วงศ์ 1 ชนิด และ อันดับ Lepidoptera 3 วงศ์ 5 ชนิด

ศัตรูพืชที่พบทั้งหมด มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

รายชื่อแมลงศัตรูพืชส่งออก (ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552)

ชื่อพืช	ชื่อแมลง		วงศ์	อันดับ	ส่วนที่ถูกทำลาย
	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์			
หน่อไม้ฝรั่ง	เพลี้ยไฟพริก	*Scirtothrips dorsalis* Hood	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟดอกไม้	*Frankliniella schultzei* Trybom	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟหน่อไม้ฝรั่ง	*Chirothrips spiniceps* Hood	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟขอบปล้องหยัก	*Microcephalothrips abdominalis* Crawford	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟฝ้าย	*Thrips palmi* Karny	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
ถั่วลันเตา	เพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก	*Frankliniella occidentalis* Pergande	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟดอกถั่ว	*Megalurothrips usitatus* Bagnall	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟฝ้าย	*Thrips palmi* Karny	Thripidae	Thysanoptera	ดอก

รายชื่อแมลงศัตรูพืชส่งออก (ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552) (ต่อ)

ชื่อพืช	ชื่อแมลง		วงศ์	อันดับ	ส่วนที่ถูกทำลาย
	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์			
ถั่วลันเตา (ต่อ)	เพลี้ยอ่อนถั่ว	*Aphis craccivora* Koch	Aphididae	Homoptera	ใบอ่อน
	ผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้าย	*Helicoverpa armigera* (Hübner)	Noctuidae	Lepidoptera	ดอก
	ผีเสื้อหนอนเจาะฝักถั่ว	*Lampides bacticus* (Linnaeus)	Lycaenidae	Lepidoptera	ฝัก
พืชตระกูลแตง	เพลี้ยอ่อนฝ้าย	*Aphis gossypii* Glover	Aphididae	Homoptera	ใบอ่อน
	เพลี้ยไฟดอกไม้	*Frankliniella schultzei* Trybom	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยไฟฝ้าย	*Thrips palmi* Karny	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	ด้วงเต่าแตงแดง	*Aulacophora indica* (Gmelin)	Chrysomelidae	Coleoptera	ใบ
	ด้วงเต่าแตงดำ	Aulacophora frontalis Baly	Chrysomelidae	Coleoptera	ใบ

รายชื่อแมลงศัตรูพืชนำเข้า (ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552)

ชื่อพืช	ชื่อแมลง		วงศ์	อันดับ	ส่วนที่ถูกทำลาย
	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์			
พืชตระกูลกะหล่ำ	เพลี้ยไฟฝ้าย	*Thrips palmi* Karny	Thripidae	Thysanoptera	ดอก
	เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ	*Lipaphis erysimi* Kaltenbach	Aphididae	Homoptera	ใบอ่อน
	เพลี้ยอ่อนลูกท้อ	*Myzus persicae* (Sulzer)	Aphididae	Homoptera	ใบอ่อน
	ผีเสื้อหนอนคืบกะหล่ำ	*Trichoplusia ni* Hübner	Noctuidae	Lepidoptera	ใบ
	ผีเสื้อหนอนกระทู้หอม	*Spodoptera exigua* (Hübner)	Noctuidae	Lepidoptera	ใบ

รายชื่อแมลงศัตรูพืชนำเข้า (ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552) (ต่อ)

ชื่อพืช	ชื่อแมลง		วงศ์	อันดับ	ส่วนที่ถูกทำลาย
	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์			
พืชตระกูลกะหล่ำ (ต่อ)	ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก	*Spodoptera litura* (Fabricius)	Noctuidae	Lepidoptera	ใบ
	ผีเสื้อหนอนกะหล่ำอินเดีย	*Artogeia canidia* (Sparman)	Pieridae	Lepidoptera	ใบ
	หนอนใยผัก	*Plutella xylostella* Linnaeus	Yponomeutidae	Lepidoptera	ใบ

รายละเอียดแมลงศัตรูพืชส่งออก-นำเข้าแต่ละชนิด

Scirtothrips dorsalis Hood

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟพริก: Chilli Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟมีขนาดลำตัวยาว 0.05-0.07 เซนติเมตร สีเหลืองอ่อน ด้านบนปล้องท้องปล้องที่ 2 ถึงปล้องที่ 7 ทั้งเพศเมียและเพศผู้มีรอยปื้นสีเทาดำและใต้รอยปื้นมีขีดสีดำ ส่วนท้องด้านล่างเฉพาะเพศเมียมีรอยขีดสีดำ

พืชอาหาร: ส้ม องุ่น มะม่วง เงาะ มังคุด ทุเรียน ลิ้นจี่ ลำไย ส้มโอ พริก ทับทิม

Frankliniella schultzei Trybom

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟดอกไม้: Common Blossom Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟที่มีขนาดลำตัวยาว 0.07-0.09 เซนติเมตร สีเหลืองใสหรือสีน้ำตาล ส่วนหัวค่อนข้างกว้าง หนวดมี 8 ปล้อง ปล้องที่ 1-2 เหลืองใส ปล้องที่ 3-5 สีน้ำตาล ปล้องที่ 6-8 สีน้ำตาลเข้ม อกปล้องแรกมีขนขนาดใหญ่จำนวน 5 คู่ ขาทุกคู่มีสีเดียวกับลำตัว ขนบริเวณปีกคู่หน้าเรียงกันเป็นเส้นปีกแบบสมบูรณ์ ส่วนท้องสีเหลืองใส

พืชอาหาร: ข้าวฟ่าง ถั่วลิสง ฝ้าย พริก หอมใหญ่ พืชตระกูลแตง ถั่วลันเตาและดอกไม้หลายชนิด

Chirothrips spiniceps Hood

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟหน่อไม้ฝรั่ง: Asparagus Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟที่มีขนาดลำตัวยาว 0.08-0.10 เซนติเมตร สีเหลืองปนน้ำตาลอ่อน ส่วนหัวแคบยืนยาวไปทางด้านหน้า หนวดปล้องแรกอ้วนและใหญ่กว่าปล้องอื่นๆ ปล้องที่ 2 ขยายออกทางด้านข้างคล้ายรูปสามเหลี่ยม อกปล้องแรกมีลักษณะคล้ายรูปสี่เหลี่ยมคางหมู

พืชอาหาร: หน่อไม้ฝรั่ง

Microcephalothrips abdominalis Crawford

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟขอบปล้องหยัก: Composite Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟที่มีขนาดลำตัวยาว 0.08-0.10 เซนติเมตร สีน้ำตาล ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอก ขอบปลายปล้องท้องทุกปล้องมีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย

พืชอาหาร: หน่อไม้ฝรั่ง

Thrips palmi Karny

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟฝ้าย: Cotton Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟที่มีขนาดลำตัวยาว 0.07-0.09 เซนติเมตร สีเหลือง หนวดมี 7 ปล้อง สีเหลือง ขาทุกคู่สีเดียวกับลำตัว ปีกสีเหลือง ขนบริเวณปีกคู่หน้าเรียงกันเป็นเส้นปีกแบบไม่สมบูรณ์

พืชอาหาร: ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าวโพด งา ทานตะวัน ฝ้าย มะขามเทศ ตำลึง บวบ มะระ มะระขี้นก ผักบุ้งจีน พริก กะเพรา กวางตุ้ง ฟัก ฟักทอง มะรุม แตงกวา ถั่วแปปผี ถั่วฝักยาว หอมใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง โหระพา ผักชี กระเจี๊ยบเขียว มะเขือชนิดต่างๆ มะเขือเทศ สะเดา แตงไทย พืชตระกูลกะหล่ำ ลำโพง กล้วยไม้ กุหลาบ จำปา บัว เบญจมาศ ดาวเรือง กระท้อน ฝรั่ง พุทรา มะม่วง มะละกอ ทุเรียน องุ่น ลิ้นจี่ กล้วย ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มังคุด แตงโม ท้อ แคนตาลูป แก้วมังกร มะม่วงหิมพานต์ ยาสูบ หม่อน หญ้าข้าวนก พญายอ วัชพืช

Frankliniella occidentalis Pergande

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟดอกไม้ตะวันตก: Western Flower Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟที่มีขนาดลำตัวยาว 0.08-0.10 เซนติเมตร สีเหลือง/น้ำตาลปนเหลือง อกปล้องแรกมีขนขนาดใหญ่จำนวน 5 คู่ บริเวณด้านบนของส่วนท้องมีรอยปื้นสีดำ

พืชอาหาร: ไม้ดอกเมืองหนาว ถั่วลันเตา

Megalurothrips usitatus Bagnall

อันดับ Thysanoptera

วงศ์ Thripidae

ชื่อสามัญ เพลี้ยไฟดอกถั่ว: Flower Bean Thrips

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยไฟที่มีขนาดลำตัวยาว 0.09-0.11 เซนติเมตร สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ส่วนหัวแคบกว่าส่วนอกเล็กน้อย หนวดมี 7 ปล้อง สีน้ำตาลเข้ม ส่วนอกปล้องแรกสีน้ำตาลเข้ม มีขนยาวบริเวณด้านข้างด้านละ 1 คู่ ขาทุกคู่สีน้ำตาลอ่อน ปีกสีน้ำตาลใส ปีกคู่หน้ามีแถบสีน้ำตาลบริเวณโคนปีก กลางปีก และปลายปีก ปล้องท้องสีน้ำตาลเข้มทุกปล้อง บริเวณปลายปล้องท้องแต่ละปล้องสีน้ำตาลอ่อน

พืชอาหาร: ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วลันเตา ถั่วพุ่ม ถั่วมะแฮะ ทานตะวัน ฝ้าย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง

Aphis craccivora Koch

อันดับ Homoptera

วงศ์ Aphididae

ชื่อสามัญ เพลี้ยอ่อนถั่ว: Cowpea Aphid

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดกลาง ลำตัวยาว 0.14-0.22 เซนติเมตร ตัวอ่อนสีเหลืองอ่อน ตัวเต็มวัยสีเทาดำหรือสีดำ ลักษณะเป็นมันเงา ส่วนหัวและหนวดปล้องสุดท้ายสีน้ำตาล

พืชอาหาร: พืชตระกูลถั่ว ถั่วลันเตา มันสำปะหลัง ละหุ่ง ผักโขม ส้ม ขี้เหล็ก กระเจี๊ยบ ชบา มะเขือ

Helicoverpa armigera (Hübner)

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Noctuidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้าย: Cotton Bollworm

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 3.0-4.0 เซนติเมตร ลำตัวและปีกสีน้ำตาลอ่อน กลางปีกของปีกคู่หน้ามีจุดสีดำข้างละ 1 จุด ปีกคู่หลังขอบปลายปีกมีแถบสีดำขนาดใหญ่

พืชอาหาร: ฝ้าย กระเจี๊ยบแดง กระเจี๊ยบเขียว กุหลาบ ทุเรียน มังคุด ข้าวโพด ยาสูบ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลิสง ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา มะเขือเทศ พริก ทานตะวัน หน่อไม้ฝรั่ง ส้มเขียวหวาน ส้มโอ องุ่น ทุเรียน

Lampides boeticus (Linnaeus)

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Lycaenidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนเจาะฝักถั่ว: Pod Borer Caterpillar

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 2.0-2.5 เซนติเมตร หัวและลำตัวสีดำไม่มีขนปกคลุม ปีกคู่หน้าและคู่หลังพื้นปีกสีดำเหลือบม่วง ปลายปีกมีลักษณะคล้ายแถบสีเทา ขอบปีกคู่หลังมีจุดสีดำเรียงตามช่องเส้นปีก

พืชอาหาร: พืชตระกูลถั่ว ถั่วลันเตา

Aphis gossypii Glover

อันดับ Homoptera

วงศ์ Aphididae

ชื่อสามัญ เพลี้ยอ่อนฝ้าย: Cotton Aphid

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 0.09-0.18 เซนติเมตร ตัวอ่อนสีเหลืองจางหรือสีขาว ตัวเต็มวัยสีเขียวอมเหลือง จนถึงสีเขียวเข้ม ขาสีเหลือง หนวดมี 6 ปล้อง หนวดปล้องที่ 1, 2 และปล้องสุดท้ายสีน้ำตาลอ่อน

พืชอาหาร: พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลแตง มะเขือเปราะ มะเขือพวง ผักบุ้งจีน ฝ้ายฟักทอง ตำลึง น้ำเต้า พริกขี้หนู พริกหยวก

Aulacophora indica (Gmelin)

อันดับ Coleoptera

วงศ์ Chrysomelidae

ชื่อสามัญ ด้วงเต่าแตงแดง: Red Cucurbid Beetle

ลักษณะสำคัญ เป็นด้วงที่มีขนาดลำตัววัดจากปลายสุดส่วนหัวถึงปลายสุดส่วนท้องยาว 0.80-1.00 เซนติเมตร ลำตัวค่อนข้างยาว สีแดงอมแสด ปีกแข็งเป็นมันวาว

พืชอาหาร: พืชตระกูลแตง

Aulacophora frontalis Baly

อันดับ Coleoptera

วงศ์ Chrysomelidae

ชื่อสามัญ ด้วงเต่าแตงดำ: Black Cucurbid Beetle

ลักษณะสำคัญ เป็นด้วงที่มีขนาดลำตัววัดจากปลายสุดส่วนหัวถึงปลายสุดส่วนท้องยาว 0.70-0.80 เซนติเมตร ลำตัวค่อนข้างยาวสีน้ำตาลแดงหรือดำ ส่วนหัวและอกมักมีสีน้ำตาลแดง ปีกแข็งเป็นมัน ขาทุกคู่สีเดียวกับส่วนหัว

พืชอาหาร: พืชตระกูลแตง

Lipaphis erysimi Kaltenbach

อันดับ Homoptera

วงศ์ Aphididae

ชื่อสามัญ เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ: Turnip Aphid

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 0.14-0.24 เซนติเมตร สีเหลืองแกมเขียวหรือสีเขียว มีไขสีขาวตามปล้องของลำตัว หนวดมี 6 ปล้อง หนวดปล้องที่ 1-2 มีสีขาวจาง ส่วนปล้องที่ 3-6 สีน้ำตาล

พืชอาหาร: พืชตระกูลกะหล่ำ

Myzus persicae (Sulzer)

อันดับ Homoptera

วงศ์ Aphididae

ชื่อสามัญ เพลี้ยอ่อนลูกท้อ: Green Peach Aphid

ลักษณะสำคัญ เป็นเพลี้ยอ่อนขนาดเล็ก ลำตัวยาว 0.12-0.21 เซนติเมตร ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ๆ มีสีชมพูอ่อนปนเหลือง ตัวเต็มวัยสีเหลืองอ่อน หรือสีเหลืองอมเขียว หนวดมี 6 ปล้อง หัวและหนวดสีเหลืองอ่อน

พืชอาหาร: ยาสูบ ข้าว งา ถั่วต่างๆ มันฝรั่ง พืชตระกูลกะหล่ำ

Trichoplusia ni Hübner

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Noctuidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนคืบกะหล่ำ: Cabbage Looper

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 2.50-3.00 เซนติเมตร หัวและลำตัวอ้วนป้อมมีขนสีเทาปกคลุม ปีกคู่หน้าพื้นปีกสีเทาเข้ม มีรอยแต้มสีดำกระจายทั่วปีก ปีกคู่หลังพื้นปีกสีน้ำตาลอ่อน ขอบปลายปีกมีแถบสีดำขนาดใหญ่

พืชอาหาร: พืชตระกูลกะหล่ำ คื่นฉ่าย มันฝรั่ง ข้าวโพด บีท ผักกาดหอม ผักกวางตุ้ง ผักกาดขาว

Spodoptera exigua (Hübner)

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Noctuidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนกระทู้หอม: Common Cutworm

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 2.00-2.50 เซนติเมตร ปีกคู่หน้าพื้นปีกสีน้ำตาล มีจุดสีน้ำตาลอ่อน 2 จุดตรงกลางปีก ปีกคู่หลังบางใสไม่มีลวดลาย

พืชอาหาร: หอมแดง กุหลาบ ถั่วฝักยาว ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา องุ่น ผักตระกูลกะหล่ำ กล้วยไม้ พริก กระเจี๊ยบเขียว หน่อไม้ฝรั่ง มันเทศ ข้าวโพด ทานตะวัน หอมใหญ่

Spodoptera litura (Fabricius)

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Noctuidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก: Beet Armyworm

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 2.80-3.00 เซนติเมตร ปีกคู่หน้าพื้นปีกสีน้ำตาลเข้มมีเส้นสีเหลืองอ่อนพาดกระจายทั่วปีก ปีกคู่หลังบางใสไม่มีลวดลาย

พืชอาหาร: พืชตระกูลกะหล่ำ ลำโพง ละหุ่ง ยาสูบ กุหลาบ บัว ถั่วเขียว พลูด่าง ส้มโอ บานชื่น โป๊ยเซียน องุ่น ทานตะวัน

Artogeia canidia (Sparman)

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Pieridae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนกะหล่ำอินเดีย: Indian Cabbage Caterpillar

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 4.00-4.50 เซนติเมตร หัวและลำตัวสีดำไม่มีขนปกคลุม ปีกคู่หน้าและคู่หลังพื้นปีกสีขาว ปลายปีกคู่หน้า มีรอยแต้มคล้ายจุดสีดำ 2 จุด ขอบปลายปีกมีรอยแต้มสีดำขนาดใหญ่ ขอบปีกคู่หลังมีรอยแต้มคล้ายจุดสีดำ 5 จุด

พืชอาหาร: พืชตระกูลกะหล่ำ

Plutella xylostella Linnaeus

อันดับ Lepidoptera

วงศ์ Plutellidae

ชื่อสามัญ ผีเสื้อหนอนใยผัก: Diamond Back Moth

ลักษณะสำคัญ ขนาดลำตัววัดจากขอบปีกด้านหนึ่งถึงขอบปีกอีกด้านหนึ่งกว้าง 0.6.-0.7 เซนติเมตร ปีกค่อนข้างแคบ ปีกคู่หน้าพื้นปีกสีเทาเข้ม มีแต้มสีเทาบริเวณขอบบนและขอบล่างของปีก ปีกคู่หลัง ปลายปีกแหลม พื้นปีกสีเทาอ่อนไม่มีลวดลาย ขอบล่างของปีกมีขนยาว

พืชอาหาร: พืชตระกูลกะหล่ำ

การศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชส่งออกและนำเข้าของพืช 4 พืชในครั้งนี้ นับว่าเป็นงานวิจัยที่มีประโยชน์อย่างมากในการค้นคว้า วิจัย และทบทวนเกี่ยวกับศัตรูพืชของพืชที่ได้ศึกษา ซึ่งสามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ ในการที่จะยืนยันถึงการพบหรือไม่พบแมลงศัตรูพืชในพืชทั้งหมดในช่วงเวลาที่ได้ศึกษา ซึ่งศัตรูพืชที่พบมีความแตกต่างจากที่เคยมีรายงาน อาทิ หน่อไม้ฝรั่ง การศึกษาครั้งนี้พบแมลงศัตรูพืช 5 ชนิด ซึ่ง Wongsiri (1991) ได้รายงานไว้ถึง 11 ชนิด เช่นเดียวกับถั่วลันเตา Wongsiri (1991) ได้รายงานไว้ถึง 18 ชนิด แต่การศึกษาครั้งนี้พบเพียง 6

ชนิด เป็นต้น ซึ่งการเตรียมพร้อมข้อมูลบัญชีรายชื่อเพื่อไว้ประกอบกับสินค้าเกษตรที่ต้องการนำเข้าส่งออก ต้องเป็นข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน มีหลักฐานยืนยันและสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดแมลงศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออก ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2552 ในพืชส่งออก 2 พืช และพืชนำเข้า 2 พืช พบแมลงศัตรู **หน่อไม้ฝรั่ง** พบแมลงศัตรูทั้งหมด 1 อันดับ 5 ชนิด และ**ถั่วลันเตา** พบแมลงศัตรูทั้งหมด 3 อันดับ 6 ชนิด **พืชตระกูลแตง** พบแมลงศัตรูทั้งหมด 3 อันดับ 5 ชนิด **พืชตระกูลกะหล่ำ** พบแมลงศัตรูทั้งหมด 3 อันดับ 8 ชนิด ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการสำรวจในแหล่งที่ปลูกพืชทั้ง 4 ชนิด แล้วยังนำมาศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานโดยการตรวจวิเคราะห์ตามหลักการตรวจวิเคราะห์และสืบค้นข้อมูลที่เป็นปัจจุบัน ซึ่งจะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการจัดทำบัญชีรายชื่อแมลงศัตรูพืชส่งออกและพืชนำเข้าที่ได้ศึกษา และสามารถนำบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่ได้ไปใช้ในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชนำเข้าทั้ง 4 พืช รวมทั้งนำไปศึกษาเพื่อพิจารณาในการกำหนดแมลงศัตรูพืชกักกัน ตลอดจนใช้เป็นหลักฐานในการสืบค้นและอ้างอิงทางวิชาการสำหรับการเจรจาต่อรองทางการค้า และกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าพืชตามพระราชบัญญัติกักพืช ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของศัตรูพืช เพื่อประโยชน์ทางการค้า จำเป็นอย่างยิ่งจะต้องศึกษาอย่างต่อเนื่องและเตรียมพร้อมข้อมูลให้เป็นปัจจุบันตลอดเวลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้องประสานกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง เพื่อกำหนดลำดับความสำคัญของพืชหรือสินค้าเกษตรที่ต้องการส่งออกหรือนำเข้า ทั้งนี้เพื่อประโยชน์สูงสุดของประเทศไทยในการเจรจาต่อรองการค้ากับประเทศคู่ค้า

เอกสารอ้างอิง

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ Terebrantia. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ.

อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์. 2543. การจัดทำบัญชีรายชื่อแมลง ไร และสัตว์ศัตรูพืช. เอกสารประกอบการบรรยายพิเศษ ในการประชุมสัมมนา เรื่อง “การจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) เพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร” วันที่ 26 กันยายน 2543 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

CABI. 2003. Crop Protection Compendium. CAB International. Wallingford, UK.

CABI. 2007. The 2007 Edition of The Crop Protection Compendium. CD-ROM. CAB International, Wallingford, UK. CD-ROM.

Flint, M.L. 1991. Integrated Pest Management for Citrus (Second edition). University of California Statewide Integrated Pest Management Project, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3303.

Pholboon, P. 1965. A Host List of The Insects of Thailand. Department of Agriculture. Thailand.

Wongsiri, N. 1991. List of Insect, Mite and Other Zoological Pests of Economic Plants in Thailand. Entomology and Zoology Division. Department of Agriculture. Bangkok. Thailand.

การศึกษาชนิดของโรคพืชของพืชส่งออก ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา พืชนำเข้าได้แก่ พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ

Diseases Survey and Diagnosis for Exported Plant : Asparagus and Pea, Imported plant: Cucumbermand Crucifer

พรพิมล อธิปัญญาคม พีระวรรณ พัฒนวิภาส สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ทัศนาพร ทัศคร ชนินทร ดวงสะอาด ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ตรวจค้นเอกสารและรวบรวมรายชื่อโรคพืชของโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตาพืช พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ที่เกิดในประเทศไทยพบโรคพืชที่เกิดจากรา แบคทีเรีย ไวรัสและไส้เดือนฝอย และจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชของหน่อไม้ฝรั่งและ ถั่วลันเตาที่มีรายงานในประเทศไทย

สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคของหน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา พบโรคลำต้นไหม้ และโรคแอนแทรคโนสของหน่อไม้ฝรั่ง พบอาการโรคของถั่วลันเตา ดังนี้ อาการ V-shape ใบจุดแผลไหม้ ใบจุดแผลเล็ก ยอดไหม้ โรคเหี่ยว และราแป้ง สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคของพืชตระกูล แตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ได้ตัวอย่างโรคพืชตระกูลกะหล่ำ จำนวน 60 ตัวอย่าง พบโรคราน้ำค้าง .ใบจุด อาการ V-shape และโรคเน่าเละ ได้ตัวอย่างโรคพืชตระกูลแตง จำนวน 30 ตัวอย่าง พบโรคราแป้ง ราน้ำค้าง ใบจุด เปลือกแตกยางไหล และไวรัส เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-01-02-51

คำนำ

ในปัจจุบันการนำสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและนำเข้านั้นจะต้องมีข้อมูลการระบาดของศัตรูพืชของประเทศที่จะส่งสินค้าออกและประเทศคู่ค้า และประเทศไทยเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก โดยสมาชิกมีพันธกรณีต้องปฏิบัติภายใต้ข้อตกลงด้วยการใช้บังคับมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) สำหรับพืชส่งออก ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่งและถั่วลันเตา ประเทศไทยมีการส่งออกพืชทั้งสองชนิดไปยังหลายประเทศ ประเทศผู้นำเข้าต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูของสินค้าเกษตร ในขณะเดียวกันการนำเข้าสินค้าเกษตร ได้แก่ พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ซึ่งประเทศไทยก็ต้องทำการวิเคราะห์ความเสี่บงศัตรูพืช ดังนั้นการสำรวจ การประเมินความรุนแรง และการจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุของโรคหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ จึงมีความสำคัญเนื่องจากได้บัญชีรายชื่อโรคของพืชทั้งสองชนิดซึ่งเป็นข้อมูลการระบาดและความรุนแรงของโรคในปัจจุบัน ตลอดจนทราบชนิดสาเหตุของโรค เพื่อนำข้อมูลเหล่านี้ไปวิเคราะห์ความเสี่ยงของศัตรูพืชต่อไป โดยการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอนุกรมวิธานทั้งหมดไปจัดทำข้อมูลบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องส่งให้ประเทศคู่ค้าได้นำไปพิจารณาก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศไทย ในขณะเดียวกันข้อมูลด้านอนุกรมวิธานก็ใช้เป็นข้อมูลสำคัญของประเทศ สำหรับเปรียบเทียบกับข้อมูลบัญชีรายชื่อของประเทศคู่ค้าที่ส่งมา เพื่อประกอบในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis) ก่อนนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศคู่ค้านอกจากนี้ข้อมูลด้านอนุกรมวิธานยังเป็นประโยชน์ในการจัดทำรายชื่อศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) เพื่อการควบคุมศัตรูพืชจากต่างประเทศไม่ให้เข้ามาแพร่กระจายในประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

2. อาหารวุ้นสังเคราะห์ potato dextrose agar (PDA), corn meal agar (CMA), V8 juice agar, RNV เป็นต้น

3. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope (LM) และ Stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายภาพ

4. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ เครื่องแก้ว กระบอกพลาสติก กรวยแก้ว จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. และกระดาษกรอง (Whatman #2) เป็นต้น

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

สืบค้นข้อมูลโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ในประเทศไทย จากเอกสารต่าง ๆ หรือจากข้อมูลอิเล็กโทรนิก

2. การสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ

เก็บตัวอย่างโรคหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำที่แสดงอาการโรคที่ใบ ดอก ผล ลำต้น และราก โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย ห่อตัวอย่างพืชที่เก็บมาด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ และข้อมูลภูมิศาสตร์ พร้อมทั้งบันทึกภาพลักษณะอาการของโรค นำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการในห้องปฏิบัติการ จัดเก็บโรคพืชที่แสดงอาการที่ใบอัดทับเป็นตัวอย่างแห้งเข้าพิพิธภัณฑ์โรคพืช ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ตึกอิงคศรีกสิการ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

3. การศึกษาสาเหตุโรคพืช

3.1 การศึกษาสาเหตุจากตัวอย่างพืชเป็นโรคโดยตรง

ศึกษาสาเหตุจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เขี่ยเชื้อจากตัวอย่างดอก ใบ ผล กิ่ง ลำต้น ราก ของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำที่เป็นโรคลงบนแผ่นสไลด์ (slide) แล้วตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 การศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค (Tissue transplant)

แยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ (ตารางที่ 1 และ 2) ตัดตัวอย่างโรคพืชบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติ ขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) แล้วบ่มไว้ในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช วางลงบนอาหาร potato

dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของราเพื่อการจำแนกชนิดของราสาเหตุต่อไป

4. การพิสูจน์เชื้อ

ทำการพิสูจน์การเกิดโรคสำหรับโรคพืชที่เป็นโรคใหม่เท่านั้น โดยทำการปลูกเชื้อส่วนของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ โดยทำแผลและไม่ทำแผลอย่างละ 10 เปรียบเทียบกับการเกิดโรคบนส่วนที่ไม่ปลูกเชื้อด้วยวิธีเดียวกันแยกเชื้อสาเหตุจากต้นที่แสดงอาการโรค เปรียบเทียบชนิดของราสาเหตุโรคใช้ในการปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มต้น – สิ้นสุด
ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ แปลงปลูกพืชของเกษตรกร
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำในประเทศไทย

ตรวจค้นเอกสารและรวบรวมรายชื่อโรคพืชของโรคของหน่อไม้ฝรั่ง และถั่วลันเตาพืชที่เกิดในประเทศไทยและจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชของหน่อไม้ฝรั่งและ ถั่วลันเตาที่มีรายงานในประเทศไทย พบโรคพืชเกิดจากรา แบคทีเรีย ไวรัสและไส้เดือนฝอย (ตารางที่ 1)

2. การสำรวจรวบรวม และศึกษาโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคชนิดต่าง ๆ ของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ จำนวน 7 ครั้ง ระหว่างเดือนกันยายน 2550 – เดือนตุลาคม 2551 จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ พะเยา ลำปาง เพชรบูรณ์ อุตรดิตถ์ ตาก สระแก้ว สุพรรณบุรี กาญจนบุรี นครราชสีมา พบโรคหน่อไม้ฝรั่งจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้แก่ โรคลำต้นไหม้ และโรคแอนแทรคโนสของหน่อไม้ฝรั่ง พบโรคถั่วลันเตา จำนวน 17 ตัวอย่าง ได้แก่ อาการ V-shape ใบจุดแผลไหม้ ใบจุดแผลเล็ก ยอดไหม้ โรคเหี่ยว และราแป้ง สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคของพืชตระกูล แตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ได้ตัวอย่างโรคพืชตระกูลกะหล่ำ จำนวน 60 ตัวอย่าง พบโรคราน้ำค้าง .ใบจุด อาการ V-shape และโรคเน่าเละ ได้ตัวอย่างโรคพืชตระกูลแตง

จำนวน 30 ตัวอย่าง พบโรคราแป้ง ราน้ำค้าง ใบจุด Gummy stem blight และไวรัส เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

3. การศึกษาสาเหตุโรคพืช

หน่อไม้ฝรั่ง

พบโรคลำต้นไหม้ สาเหตุเกิดจากรา *Phomopsis asparagi* ระบาดที่จังหวัดกาญจนบุรี พบโรคในเดือนมกราคม กุมภาพันธ์และมีนาคม

โรคแอนแทรคโนส สาเหตุเกิดจากรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบที่จังหวัดกาญจนบุรี

ถั่วลันเตา

พบอาการโรคของถั่วลันเตา มีอาการดังนี้ อาการ V-shape ใบจุดแผลไหม้ ใบจุดสาเหตุเกิดจาก *Ascochyta* ยอดไหม้ โรคเหี่ยว สาเหตุเกิดจาก *Fusarium oxysporum* และราแป้ง พบที่จังหวัดเชียงใหม่

พืชตระกูลแตง

พบโรคราแป้งสาเหตุเกิดจากรา *Oidium* ราน้ำค้างสาเหตุเกิดจากรา *Pseudoperonospora cubensis* ใบจุดสาเหตุเกิดจากรา *Cercospora* เปลือกแตกยางไหลสาเหตุเกิดจากรา *Didymella bryoniae* (teleomorp) และยังพบ *Phoma cucurbitacearum* (anamorph) ด้วย พบระบาดที่จังหวัดเชียงราย และพะเยา ใบด่างที่เกิดจากไวรัส

พืชตระกูลกะหล่ำ

พบโรคใบจุดสาเหตุเกิดจากเกิดจาก *Alternaria brassicicola*, *A. brassicae* , *Cercospora lactucae-sativa* โรคราน้ำค้างสาเหคุเกิดจาก *Peronospora parasitica* โรครากบวมสาเหตุเกิเดจาก *Plasmodiophora brassicae* โรคเน่าเละ อาการ V shape

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ตรวจค้นเอกสารและรวบรวมรายชื่อโรคพืชของโรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตาพืช พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ที่เกิดในประเทศไทยพบโรคพืชที่เกิดจากรา แบคทีเรีย ไวรัสและไส้เดือนฝอย และจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืชในประเทศไทย

สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคของหน่อไม้ฝรั่ง พบโรคลำต้นไหม้ และโรคแอนแทรคโนสง พบอาการโรคของถั่วลันเตา ดังนี้ อาการ V-shape ใบจุดแผลไหม้ ใบจุดแผลเล็ก ยอดไหม้ โรคเหี่ยว และราแป้ง สำรวจ และเก็บตัวอย่างโรคของพืชตระกูล แตงและพืชตระกูลกะหล่ำ ได้ตัวอย่างโรคพืชตระกูลกะหล่ำ จำนวน 60 ตัวอย่าง พบโรคราน้ำค้าง .ใบจุด อาการ V-shape และโรคเน่าเละ

ได้ตัวอย่างโรคพืชตระกูลแตง จำนวน 30 ตัวอย่าง พบโรคราแป้ง ราน้ำค้าง ใบจุด เปลือกแตกยาง ไหล และไวรัส เก็บตัวอย่างโรคพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

คำขอบคุณ (ถ้ามี)

เอกสารอ้างอิง

ภาคผนวก (ถ้ามี)

ตารางที่ 1: โรคของหน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลันเตา พืชตระกูลแตงและพืชตระกูลกะหล่ำที่มีรายงานในประเทศไทย

พืช	รา	แบคทีเรีย	ไวรัส	ไส้เดือนฝอย
หน่อไม้ฝรั่ง	10	2	2	5
ถั่วลันเตา	18	2	2	2
พืชตระกูลแตง	35	2	9	4
พืชตระกูลกะหล่ำ	26	5	2	5

การศึกษาชนิดวัชพืชในพืชส่งออก : หน่อไม้ฝรั่ง

Study on Weed Species in Exported Crops : Asparagus.

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์[1] เบญจมาภรณ์ ลิ้มประเสริฐ[2] มัตติกา ทองรส[3]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2]สำนักการเกษตรอำเภอดำเนินสะดวก [3]สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดวัชพืชในหน่อไม้ฝรั่ง ได้ดำเนินงานสำรวจในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยคือ ภาคตะวันตกที่จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ภาคกลางที่จังหวัด นครปฐม และสุพรรณบุรี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัดกาฬสินธุ์ เริ่มดำเนินงานตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนสิงหาคม 2552 จากการสำรวจและศึกษาชนิดวัชพืชในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่ง พบวัชพืชทั้งหมด 60 ชนิด จัดจำแนกได้ 24 วงศ์ (family) 54 สกุล (genus) 60 พันธุ์ (species) วัชพืชชนิดที่พบปริมาณมากและมีความถี่ที่สำรวจพบสูงจะจัดเป็นวัชพืชเด่น (dominant species) ของการสำรวจในครั้งนี้โดยพิจารณาจากค่า sum dominance ratio (SDR) ซึ่งพบ 1 พันธุ์/ชนิด คือแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) มีค่า SDR เท่ากับ 19.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวัชพืชที่พบว่าเด่นลำดับรอง (Co-dominant species) มี 6 ชนิดคือ หญ้าตีนนก (*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koel.) หญ้านกสีชมพู (*Echinocloa colona* (L.) Link.) ผักขม (*Amaranthus viridis* L.) น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) ผักเบี้ยใหญ่ *(Portulaca oleracea* L.) และผักเบี้ยหิน (*Trianthema protulacastrum* L.) มีค่า SDR 8.4, 6.4, 6.2, 5.9, 5.5 และ 5.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ชนิดวัชพืชที่สำรวจพบในครั้งนี้สามารถนำไปจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่งเพื่อส่งให้ประเทศคู่ค้าในการส่งออก หรือการขอเปิดตลาดหน่อไม้ฝรั่งตามข้อตกลงมาตรการสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) นอกจากนี้ยังใช้เป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูล และการจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป

รหัสโครงการวิจัย 07 01 49 02

คำนำ

หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinallis* L.) มีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรป และเอเชีย เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีอายุหลายปี มีลำต้นใต้ดิน (rhizome) ส่วนของลำต้นเหนือดินเจริญมาจากตาข้าง

ของลำต้นใต้ดิน เมื่อเจริญขึ้นมาแล้วเรียกหน่อ ปลายหน่อปกคลุมด้วยใบแท้ เมื่อหน่อเจริญ ใบแท้เป็นเกล็ดบาง ๆ มีส่วนของกิ่งก้านที่เปลี่ยนแปลงเป็นลักษณะเส้นทำหน้าที่แทนใบ เรียกคลาโดด (cladodes) หรือ คลาโคฟิล (cladophyll) ดอกของหน่อไม้ฝรั่งเป็นดอกแยกเพศและแยกต้น ดอกตัวผู้ลักษณะรูประฆัง สีเขียวแกมเหลือง ขนาดใหญ่และยาวกว่าดอกตัวเมีย เกิดตามข้อเป็นกลุ่ม ๆ ละ 2-3 ดอก ดอกตัวเมียขนาดเล็กมีไม่มากเท่าดอกตัวผู้ ผลแบบ เบอร์รี่ (berry) ขนาดเล็กสีเขียว เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีแดง รูปกลม มีเมล็ด 3-6 เมล็ด สีดำรูปกึ่งกลมและเหลี่ยม (http:www.ku.ac.th/e-magazine/feb49/agri/spear.htm.)

หน่อไม้ฝรั่งจัดเป็นพืชผักเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นประเทศที่ภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหน่อไม้ฝรั่งคือมีอุณหภูมิเฉลี่ย 25-30 องศาเซลเซียส หน่อไม้ฝรั่งจึงไม่มีการฟักตัว ในขณะที่ประเทศในยุโรป สหรัฐอเมริกา และญี่ปุ่น ในช่วงฤดูหนาวหน่อไม้ฝรั่งจะฟักตัว แต่ตลาดโลกมีความต้องการหน่อไม้ฝรั่ง ประเทศไทยจึงต้องช่วงชิงตลาดนี้ไว้ให้ได้ อีกทั้งเกษตรกรที่ปลูกหน่อไม้ฝรั่งจะมีรายได้ดี และสามารถติดต่อขายให้กับบริษัทผู้ส่งออกได้ เกษตรกรที่ปลูกหน่อไม้ฝรั่งมิได้ปลูกเป็นแปลงใหญ่คือ เกษตรกรส่วนใหญ่แต่ละรายจะมีพื้นที่ปลูกประมาณ 2-10 ไร่ และการปลูกจะเริ่มไม่พร้อมกัน ผลผลิตของหน่อไม้ฝรั่งจึงทยอยออกและส่งให้ตลาดได้ตลอดปีช่วงที่ผลผลิตหน่อไม้ฝรั่งได้มากและมีคุณภาพคือปลูกในฤดูหนาว(http:www.ku.ac.th/e-magazine/febu49/agri/spear.htm.) เกษตรกรที่ปลูกหน่อไม้ฝรั่งส่วนใหญ่จะมีรายได้ดี ถ้าปลูกหน่อไม้ฝรั่งได้เกรด ซึ่งบริษัทได้กำหนดขึ้นเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการรับซื้อได้แก่ เกรด A ตูม ราคารับซื้อกิโลกรัมละ 52.61 บาท เกรด A บานราคากิโลกรัมละ 42-48 บาท เกรด B ราคากิโลกรัมละ 30-35 บาท ในกรณีที่ตกเกรดบริษัทไม่รับซื้อ ก็จะขายให้พ่อค้าท้องถิ่นในราคากิโลกรัมละ 7-27 บาท (http://it doa.go.th./vichakan/news.news.php.? mew sid=5)

แหล่งปลูกหน่อไม้ฝรั่งที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่จังหวัดราชบุรี นครปฐม กาญจนบุรี สุพรรณบุรี รองลงมาได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาฬสินธุ์ มหาสารคาม สระแก้ว นครราชสีมา อุดรธานี และร้อยเอ็ด พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ ยูซี 157, บร๊อคอินพรู๊ฟ, บร๊อคอิมพีเรียล และแอทวาส์ (ฝ่ายข้อมูลส่งเสริม และการจัดการสินค้า, 2547)

ในปี 2546 - 49 หน่อไม้ฝรั่งจัดเป็นพืชผักส่งออกที่มีความสำคัญของประเทศ เนื่องจากมีมูลค่าส่งออกเป็นอันดับที่ 2 ของกลุ่มผักสดหรือแช่เย็น ตลาดหลักของหน่อไม้ฝรั่งอยู่ที่ญี่ปุ่น และไต้หวัน มีมูลค่าสูงมากถึง 625.70 และ 246.85 ล้านบาท หรือร้อยละ 66.57 และ 26.26 ของมูลค่า

การส่งออกหน่อไม้ฝรั่งเฉลี่ยทั้งหมด และมีโอกาสขยายปริมาณการส่งออกได้เพิ่มมากขึ้นถ้าได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามที่ตลาดทั้งสองกำหนด นอกจากประเทศดังกล่าวทั้งสองแล้ว ประเทศไทยยังสามารถขยายฐานการส่งออกไปยังประเทศอื่น ๆ เช่น กลุ่มประเทศยุโรป และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น (http://production.doac.go.th)

ปัจจุบันภายใต้การตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ได้ระบุไว้ชัดเจนว่าประเทศสมาชิกมีสิทธิ์และพันธกรณีพื้นฐานในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยนั้นจากต่างประเทศมิให้เข้าไปเป็นอันตรายหรือเกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม วิธีการปฏิบัติคือ ประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืช โดยวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) ซึ่งอาจจะเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช หรือวัชพืช ซึ่งอาจจะติดมากับสินค้าเกษตรที่นำเข้า ประเทศผู้นำเข้าจึงจะต้องร้องขอบัญชีรายชื่อศัตรูพืชและข้อมูลด้านศัตรูพืชแต่ละชนิดของสินค้าเกษตรนั้น ๆ ประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรจึงต้องจัดส่งบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List : PL) รวมทั้งข้อมูล และขั้นตอนในการผลิตพืชประกอบการของเปิดตลาด หากประเทศผู้ส่งออกไม่สามารถจัดเตรียมข้อมูลดังกล่าวข้างต้นได้ จะไม่ได้รับอนุญาตให้นำเข้าสินค้าเกษตรนั้น ๆ ซึ่งจะเป็นการกีดกันทางการค้าด้านหนึ่ง ดังนั้นหน้าที่ของกรมวิชาการเกษตร ในฐานะที่เป็น NPPO (National Plant Protection Organization) จึงมีหน้าที่ต้องเตรียมข้อมูลโดยการสำรวจศัตรูพืชที่จะส่งออกทุกชนิด

สำหรับงานสำรวจวัชพืชในหน่อไม้ฝรั่งนั้น ได้มีรายงานการสำรวจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 – 2548 (เสริมศิริ และจันทร์เพ็ญ, 2548) แต่เพื่อให้ได้ข้อมูลบัญชีรายชื่อของวัชพืชในหน่อไม้ฝรั่งที่เป็นปัจจุบัน และครอบคลุมพื้นที่เพิ่มขึ้นจึงได้เริ่มงานสำรวจวัชพืชในหน่อไม้ฝรั่งอีกครั้งในปี พ.ศ. 2550 – 2552 เพื่อส่งให้ประเทศคู่ค้าในกรณีที่ขอเปิดตลาด ตามข้อตกลงมาตรการสุขอนามัย (SPS Agrement) เป็นการสนับสนุนการส่งออกเพื่อเพิ่มรายได้ให้เกษตรกร และประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แปลงสุ่ม (Sample Plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร
- เลนส์ขยาย และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องตา
- กล้องบันทึกภาพ
- วัสดุ และอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเช่น กรรไกร ถุงพลาสติก เฟรมอัดตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์/กระดาษฟาง กระดาษลูกฟูก และเชือกหรือสายรัด
- อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูล เช่น กระดาษ หรือแบบฟอร์มในการบันทึกข้อมูล
- เอกสารและตำราประกอบการจำแนกและระบุชื่อพืช

วิธีการ

1. การค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลวิชาการ

ค้นคว้าเอกสารวิชาการต่าง ๆ เกี่ยวกับหน่อไม้ฝรั่ง เช่น ชนิดและพันธุ์ของหน่อไม้ฝรั่ง แหล่งปลูก การระบาดของศัตรูพืช และสถิติการส่งออก

วิธีการ

แผนการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งโดยแบ่งเขตสำรวจตามภาคต่าง ๆ คือ **ภาคกลาง** : จังหวัดนครปฐมที่อำเภอเมือง และอำเภอกำแพงแสน จังหวัดสุพรรณบุรีที่อำเภออู่ทอง และอำเภอสองพี่น้อง **ภาคตะวันตก** : จังหวัดกาญจนบุรี ที่อำเภอเมือง อำเภอท่าม่วง และอำเภอท่ามะกา จังหวัดราชบุรีที่อำเภอเมือง อำเภอดำเนินสะดวก อำเภอโพธาราม และอำเภอสวนผึ้ง จังหวัดเพชรบุรีที่ อำเภอชะอำ และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่อำเภอกุยบุรี และ**ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ** : จังหวัดกาฬสินธุ์ ที่อำเภอเมือง และอำเภอยางตลาด

วิธีสุ่มตัวอย่างวัชพืชในการสำรวจนั้นใช้แปลงสุ่ม (sample plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี Unrestricted sampling method (Anonymous, 1982) ทำการสุ่ม 4 จุดต่อหนึ่งแปลง บันทึกจำนวนชนิด นับปริมาณวัชพืชแต่ละชนิด และหาชื่อวัชพืช บันทึกภาพ เก็บตัวอย่างวัชพืชที่สมบูรณ์ คือมีส่วนของราก ต้น ใบ และดอก อัดไว้ในแผงไม้ เพื่อนำมาตากแห้ง รวมถึงการเก็บเมล็ดที่สมบูรณ์ และเก็บรักษาไว้ที่ห้องเก็บตัวอย่างพรรณไม้ เพื่อใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป ส่วนการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative characteristic) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงเพื่อจัดลำดับวัชพืชเด่น (dominant species) และวัชพืชรอง (co-dominant species) นั้นได้อาศัยค่าของ sum dominance ratio ซึ่งคำนวณได้จากค่า relative density และค่า relative frequency จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Relative density (RD)} = \frac{\text{Density for a species x 100}}{\text{Total density for all species}}$$

$$\text{Relative frequency (RF)} = \frac{\text{Frequency value for a species x 100}}{\text{Total frequency value for all species}}$$

$$\text{Sum dominant ratio (SDR)} = \frac{\text{RD + RF}}{2}$$

การจำแนกวัชพืช (classification) และการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ (identification) นั้นได้อาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของนักวิชาการและเอกสารวิชาการดังต่อไปนี้

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.
2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.
3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.
4. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.
5. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.
6. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.
7. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.
8. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.
9. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.
10. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. . Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.
11. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาในการดำเนินการ เริ่มตั้งแต่สืบค้นข้อมูล วางแผนการสำรวจวัชพืชในพื้นที่ปลูกหน่อไม้ฝรั่ง และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช ได้ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2552

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การปลูกหน่อไม้ฝรั่งนั้นเกษตรกรนิยมปลูกแบบยกร่อง โดยปลูกหน่อไม้ฝรั่งบนสันร่อง แนวร่องนั้นอาจจะมีน้ำขังหรือไม่มีก็ได้แล้วแต่สภาพของพื้นที่ในแต่ละภาคหรือจังหวัด การยกร่องในที่

ลุ่มที่มีน้ำขังนั้น สันร่องกว้าง 4-5 เมตร ร่องน้ำกว้างประมาณ 1 เมตร ระยะปลูกระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ระยะระหว่างแถว 1-1.20 เมตร เกษตรกรที่จังหวัดราชบุรี และนครปฐม จะปลูกหน่อไม้ฝรั่งในลักษณะดังกล่าว สำหรับเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดกาฬสินธุ์นั้น จะทำแปลงหน่อไม้ฝรั่งโดยการยกร่องเช่นกัน แต่เป็นการยกร่องในที่ดอน คือระหว่างร่องจะไม่มีน้ำขัง ความกว้างของสันร่องประมาณ 120 – 150 เซนติเมตร และร่องน้ำกว้าง 30-40 เซนติเมตร เพียงแต่ในร่องน้ำไม่มีน้ำขัง ระยะปลูกก็จะใกล้เคียงกับปลูกในที่ลุ่ม คือระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างแถว 150 เซนติเมตร

พันธุ์หน่อไม้ฝรั่งที่เกษตรกรใช้ปลูกเป็นการค้าหลักมีจำนวน 8 สายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์แมรี่วอชิงตัน, พันธุ์แคลิฟอร์เนีย 309, พันธุ์แคลิฟอร์เนีย 500, พันธุ์ยูซี่ 157, พันธุ์บร๊อคอิมปรู๊พ, พันธุ์อพอลโล, พันธุ์บร๊อคอิมพีเรียล และพันธุ์แอทลาส (http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=5)

การปลูกหน่อไม้ฝรั่ง พบว่ามีศัตรูพืชหลายชนิด ด้านโรคพืชมีโรคที่สำคัญเช่น โรคใบเทียนร่วง, โรคต้นไหม้, โรคแอนแทรกโนส และโรคเท้าเปียก ด้านแมลงมีแมลงที่สำคัญเช่น หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก หนอนคืบ เพลี้ยไฟฝ้าย และเพลี้ยไฟหอม http://it.doa.go.th/vichakan/news.php?newsid=5) ด้านวัชพืชนั้นเสริมศิริและจันทร์เพ็ญ(2548) รายงานชนิดวัชพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่งของประเทศไทย แบ่งเป็นวัชพืชใบแคบ 13 ชนิด ได้แก่ หญ้านก หญ้านกสีชมพู หญ้าหวาย หญ้าตีนนก หญ้าตีนนกเล็ก หญ้าปากควาย หญ้าตีนติด หญ้ารังนก หญ้าแพรก หญ้าดอกขาว ผักปลาย ผักปลาบไร่ วัชพืชใบกว้าง 31 ชนิดได้แก่ ผักโขม ผักเบี้ยหิน พรมพระอินทร์ ผักเบี้ยใหญ่ น้ำนมราชสีห์ ผักโขมหิน หญ้าละออง ปอวัชพืช ผักโขมหนาม เทียนนา ผักเสี้ยนขน เซ่งใบมน กะเม็ง กระต่ายจาม หญ้ายาง ลูกใต้ใบ หญ้าลิ้นงู ผักเสี้ยน ผักเสี้ยนผี โคกกระสุน เงี่ยงปลา ฮ่วมชาวนา ตีนตุ๊กแก ถั่วผี กระดุมใบเล็ก โสนคางคก ผักเป็ดน้ำ พันงูขาว สาบแร้งสาบกา ไมยราบ และวัชพืชพวกกก 3 ชนิด คือ แห้วหมู กกทราย และหนวดปลาดุก สำหรับการกำจัดวัชพืชนั้นส่วนใหญ่ใช้แรงงานคนถอนหรือตัด กำจัดวัชพืชเดือนละครั้งร่วมกับการใช้แกลบดิบ หรือฟางข้าวคลุมดินตั้งแต่วัชพืชยังมีขนาดเล็ก สารกำจัดวัชพืชที่แนะนำให้ใช้ในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งมี 2 ชนิดคือ เพนดิเมทาลิน และเมทริบูซิน พ่นคลุมดินก่อนวัชพืชงอกก่อนย้ายกล้า (นิรนาม, 2547) แต่เนื่องจากหน่อไม้ฝรั่งที่ปลูกส่วนใหญ่เพื่อส่งออก จึงมีข้อจำกัดเกี่ยวกับการใช้สารกำจัดศัตรูพืชเกษตรกรจึงมักไม่ใช้สารกำจัดวัชพืช ถ้าปัญหาวัชพืชไม่มากจนเกินกำลังของการใช้แรงงาน

จากการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งตามพื้นที่ที่ได้กำหนดไว้ในแผนการศึกษาพบวัชพืชทั้งหมด 60 ชนิด สามารถจำแนกได้ 24 วงศ์ (family) 54 สกุล (genus) 60 พันธุ์ (species)

วิเคราะห์ข้อมูลจากค่าความหนาแน่น และความถี่ของวัชพืชที่พบแต่ละชนิดเพื่อหาค่า RD RF และ SDR ของวัชพืชแต่ละชนิด สามารถแบ่งวัชพืชได้ 4 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 1)

1. กลุ่มวัชพืชเด่น (dominant species) เป็นวัชพืชที่พบในปริมาณมากและพบบ่อยครั้งในการวางกรอบสำรวจ มีค่า SRD สูงสุดคือ 19.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่แห้วหมู

2. กลุ่มวัชพืชที่เด่นลำดับรอง (co-dominant species) พบ 6 ชนิด คือ หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ และผักเบี้ยหิน มีค่า SDR 8.4, 6.4, 6.2, 5.9, 5.5 และ 5.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3. กลุ่มวัชพืชที่พบระดับปานกลาง มีจำนวนวัชพืชที่พบทั้งหมด 16 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนกา หญ้าตอแหล หญ้าปากควาย หญ้าหางนกยูงใหญ่ หญ้าดอกขาว หญ้าตีนติด หญ้ายาง ผักขมหิน สร้อยนกเขา กะเม็ง ผักเสี้ยนผี หญ้าละออง พรมพระอินทร์ ผักเสี้ยนดอกขาว หญ้าแพรก เงี่ยงปา มีค่า SDR ตั้งแต่ 1.0 - 3.3 เปอร์เซ็นต์

4. กลุ่มวัชพืชที่พบระดับน้อยมีจำนวนทั้งหมด 37 ชนิดมีค่า SDR ต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ เซ่งใบมน ตีนตุ๊กแก เทียนนา หนวดปลาดุก หญ้าดอกชมพู กกสามเหลี่ยมใหญ่ หูปลาช่อน หญ้ารังนก ต้อยติ่ง ผักเผ็ด สาบแร้งสาบกา ขี้ไก่ย่าน ถั่วลิสง หญ้ากาบหอย กกขนาก ตำแย โทงเทง ผักบุ้ง ผักปลาบ บานไม่รู้โรยป่า ปอวัชพืช ผักแครด ผักปลาบ มะระขี้นก ลูกใต้ใบ สะอึก สาบเสือ โสนคางคก โสนดอน หญ้าแดง อุตพิต หญ้าลิ้นงู ครอบฟันสี ตดหมูตดหมา ตำลึง ผักเสี้ยนดอกม่วง และหญ้าไข่เหา

วัชพืชที่สำรวจพบในแปลงหน่อไม้ฝรั่งนั้นสามารถจัดแบ่งออกตามลักษณะและขนาดของใบ เพื่อความเหมาะสมในการป้องกันกำจัดโดยใช้สารกำจัดวัชพืชให้มีประสิทธิภาพ กล่าวคือสารกำจัดวัชพืชบางชนิดมีคุณสมบัติกำจัดวัชพืชแบบเลือกทำลาย สารกำจัดวัชพืชประเภทนี้มีผลความเป็นพิษต่อวัชพืชบางชนิด แต่อาจไม่มีผลความเป็นพิษต่อพืชบางชนิด ตัวอย่างเช่น สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ใช้กำจัดวัชพืชประเภทใบกว้างได้แต่ไม่เป็นพิษต่อข้าว หรือวัชพืชพวกใบแคบ แต่สารควิซาโลฟอบ-พี-เทฟิวริลใช้พ่นคลุมไปบนต้นถั่วเหลืองสามารถกำจัดวัชพืชใบแคบได้แต่ไม่เป็นพิษต่อถั่วเหลือง และวัชพืชใบกว้าง ในทางตรงกันข้ามสารกำจัดวัชพืชบางชนิดไม่เลือกทำลายสารชนิดมีคุณสมบัติทำลายหรือเป็นพิษกับวัชพืช/พืชทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นวัชพืชใบแคบ ใบกว้าง หรือกก เช่น พาราควอท และไกลโฟเสท เป็นต้น (นิรนาม, 2547) ดังนั้นเพื่อให้สอดคล้องกับขบวนการในการป้องกันกำจัดจึงจัดแบ่งเป็นกลุ่มวัชพืชที่พบในครั้งนี้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ (ตารางที่ 1)

1. กลุ่มวัชพืชใบกว้าง (B) 44 ชนิด เป็นกลุ่มวัชพืชที่มีขนาดใบกว้างกว่าวัชพืชใบแคบ มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปไข่ รูปกลม หรือเป็นเหลี่ยม เป็นต้น ประกอบด้วยวัชพืชหลายวงศ์คือ Amaranthaceae, Euphorbiaceae, Portulacaceae, Aizoaceae, Nyctaginaceae, Asteracea, Papilionoideae, Scrophulariaceae, Sterculiaceae, Onagraceae,

Acanthaceae, Urticaceae, Solanaceae, Comvolvulaceae, Commelinaceae, Tiliaceae, Malvaceae และ Rubiaceae

2. กลุ่มวัชพืชใบแคบ (N) 12 ชนิด เป็นกลุ่มวัชพืชที่ใบขนาดเล็กคือใบแคบแต่เรียวยาว ปลายใบแหลม มีเส้นใบแบบขนาน มีส่วนของใบและกาบใบ ลำต้นมีข้อปล้อง ใบจะเรียงเป็น 2 แถว เป็นวัชพืชในวงศ์ Poaceae ทั้งหมด

3. กลุ่มวัชพืชพวกกก (S) 4 ชนิด เป็นกลุ่มวัชพืชที่มีใบขนาดเล็ก และแคบเรียวยาว เช่นเดียวกับวัชพืชใบแคบ แต่มีข้อแตกต่างคือ ลำต้นไม่มีข้อปล้องมักเป็นเหลี่ยม/สามเหลี่ยม ใบจะเรียงเป็น 3 แถว เป็นวัชพืชในวงศ์ Cyperaceae

จากการสำรวจวัชพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่งสามารถสรุปวัชพืชที่พบในแปลงหน่อไม้ฝรั่งตามภาค/จังหวัดต่าง ๆ ได้ดังนี้

ภาคกลาง : ที่จังหวัดนครปฐม พบวัชพืชทั้งหมด 40 ชนิด เรียงตามลำดับความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ แห้วหมู หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ ผักเบี้ยหิน หญ้าตีนกา หญ้าตอแหล หญ้าปากควาย หญ้าดอกขาว หญ้าตีนติด หญ้ายาง ผักขมหิน พรมพระอินทร์ หญ้าแพรก เงี่ยงปา เซ่งใบมน ตีนตุ๊กแก เทียนนา หนวดปลาดุก กกสามเหลี่ยมใหญ่ หูปลาช่อน หญ้ารังนก ต้อยติ่ง หญ้ากาบหอย โทงเทง ผักปลาบ ปอวัชพืช ผักปลาบ ลูกใต้ใบ สะอึก โสนคางคก โสนดอน ครอบฟันสี ตดหมูตดหมา ตำลึง ผักเสี้ยนดอกม่วง และหญ้าไข่เหา

จังหวัดสุพรรณบุรี พบวัชพืชทั้งหมด 19 ชนิด เรียงตามลำดับความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ แห้วหมู หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ ผักเบี้ยหิน หญ้าตอแหล หญ้าดอกขาว กะเม็ง ผักเสี้ยนผี หญ้าละออง ผักเสี้ยนดอกขาว หญ้าแพรก ตีนตุ๊กแก เทียนนา หนวดปลาดุก ผักบุ้ง และโสนคางคก

ภาคตะวันตก : ที่จังหวัดกาญจนบุรีพบวัชพืชทั้งหมด 37 ชนิด เรียงลำดับตามความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ แห้วหมู หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ ผักเบี้ยหิน หญ้าตีนกา หญ้าตอแหล หญ้าปากควาย หญ้าหางนกยูงใหญ่ หญ้าตีนติด หญ้ายาง ผักขมหิน กะเม็ง ผักเสี้ยนผี หญ้าละออง พรมพระอินทร์ หญ้าแพรก เงี่ยงปา เซ่งใบมน ตีนตุ๊กแก เทียนนา หญ้ารังนก ต้อยติ่ง ผักเผ็ด ถั่วลิสงนา ตำแย ผักปลาบ ปอวัชพืช ผักปลาบ สะอึก สาบเสือ โสนดอน หญ้าแดง หญ้าลิ้นงู และผักเสี้ยนดอกม่วง

จังหวัดราชบุรี สำรวจพบวัชพืชทั้งหมด 29 ชนิด เรียงลำดับตามความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ แห้วหมู หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ หญ้าตีนกา หญ้าตอแหล หญ้าปากควาย หญ้าดอกขาว หญ้าตีนติด หญ้ายาง ผักขมหิน กะเม็ง

ผักเสี้ยนผี หญ้าละออง หญ้าแพรก เงี่ยงปา เซ่งใบมน เทียนนา หนวดปลาดุก หญ้ารังนก สาบแร้งสาบกา ขี้ไก่ย่าน ลูกใต้ใบ หญ้าลิ้นงู ผักเสี้ยนดอกม่วง และหญ้าไข่เหา

จังหวัดเพชรบุรี สำรวจพบวัชพืชทั้งหมด 19 ชนิด เรียงลำดับความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ แห้วหมู หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ หญ้าตีนกา หญ้าปากควาย หญ้าดอกขาว หญ้าตีนติด หญ้ายาง ผักขมหิน กะเม็ง หญ้าละออง หญ้าแพรก เทียนนา หญ้ารังนก ลูกใต้ใบ ผักเสี้ยนดอกม่วง และหญ้าไข่เหา

จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำรวจพบวัชพืชทั้งหมด 14 ชนิด เรียงลำดับตามความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ แห้วหมู หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ ผักเบี้ยหิน หญ้าตีนกา หญ้าปากควาย หญ้ายาง สร้อยนกเขา หูปลาช่อน ปอวัชพืช และอุตพิต

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : ที่จังหวัดกาฬสินธุ์ สำรวจพบวัชพืชทั้งหมด 9 ชนิด เรียงลำดับตามความเด่นของวัชพืชได้ดังนี้ หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักเบี้ยหิน หญ้าปากควาย หญ้าตีนติด สร้อยนกเขา ผักเสี้ยนผี พรมพระอินทร์ และบานไม่รู้โรยป่า

ผลการสำรวจวัชพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่งนั้น พบว่ามีชนิดวัชพืชในภาพรวม 60 ชนิด แต่ในสภาพของแปลงหน่อไม้ฝรั่งของเกษตรกรนั้น พบปัญหาวัชพืชค่อนข้างน้อย เพราะว่ากำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานผสมผสานกับการใช้วัสดุคลุมดิน เช่น แกลบ และฟางข้าว และดูแลแปลงอย่างสม่ำเสมอ คือกำจัดวัชพืชประมาณเดือนละครั้ง เกษตรกรดูแลได้ทั่วถึงเนื่องจากพื้นที่ปลูกหน่อไม้ฝรั่งของเกษตรกรส่วนใหญ่แต่ละรายไม่มากคือ 2-5 ไร่ หรือขนาดใหญ่ก็ประมาณ 10 ไร่ ในกรณีที่เกษตรกรดูแลแปลงดีจะพบว่าไม่มีวัชพืชหรือมีวัชพืชน้อยมาก

ข้อมูลการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกหน่อไม้ฝรั่งนอกจากจะทำให้เห็นภาพรวมของการแพร่กระจายของวัชพืชและปัญหาความรุนแรงของวัชพืชแล้ว สิ่งที่สำคัญอีกด้านคือใช้อ้างอิงทางวิชาการตามมาตรฐานสากลในการจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชในหน่อไม้ฝรั่งส่งให้ประเทศคู่ค้าในกรณีที่มีการร้องขอ หรือบางครั้งในกรณีที่มีปัญหาข้อขัดแย้งเกี่ยวกับศัตรูพืช และเป็นเอกสารประกอบการขอเปิดตลาดการค้ากับประเทศต่าง ๆ ในการส่งออกหน่อไม้ฝรั่ง

นอกจากข้อมูลรายชื่อวัชพืชที่ได้จากการสำรวจแล้ว ยังได้มีการจัดเก็บตัวอย่างวัชพืชเพื่อจัดทำเป็นพรรณไม้แห้ง รวมถึงเมล็ดวัชพืช เพื่อใช้เป็นหลักฐานในการเทียบเคียงหาชื่อวัชพืช และเป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. การศึกษาชนิดวัชพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่งของประเทศไทย พบวัชพืชทั้งหมด 60 ชนิด จำแนกได้ 24 วงศ์ (family) 54 สกุล (genus) 60 พันธุ์ (species) และสามารถนำวัชพืชที่ได้ระบุชื่อ (indentification) พร้อมทั้งจัดลำดับชนิด (Classification) ตามอนุกรมวิธานพืชเพื่อจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชในหน่อไม้ฝรั่ง หรือในกรณีการขอเปิดตลาดในการส่งออกหน่อไม้ฝรั่ง

2. วัชพืชเด่นในการสำรวจมี 1 ชนิด คือแห้วหมู วัชพืชเด่นลำดับรองมี 6 ชนิดคือ หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม น้ำนมราชสีห์ ผักเบี้ยใหญ่ และผักเบี้ยหิน

3. การจำแนกวัชพืชตามรูปร่าง และลักษณะของใบนั้น แยกเป็น วัชพืชใบกว้างได้ 44 ชนิด วัชพืชใบแคบ 12 ชนิด และวัชพืชพวกกก 4 ชนิด ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยด้านการจัดการวัชพืชให้มีประสิทธิภาพ

4. ได้ภาพต้น และเมล็ดวัชพืชในแปลงหน่อไม้ฝรั่ง เพื่อเตรียมจัดพิมพ์เอกสารเผยแพร่เป็นคู่มือ การจำแนกชนิดวัชพืช และเป็นหลักฐานในการสืบค้นและงานวิจัยด้านวัชพืช

เอกสารอ้างอิง

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.
2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.
3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.
4. ฝ่ายข้อมูลส่งเสริม และจัดการสินค้าเกษตร : 2547. หน่อไม้ฝรั่ง และสถิติการปลูกหน่อไม้ฝรั่ง ปี 2546/2547 . กรมส่งเสริมการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพ ฯ .6 หน้า
5. เสริมศิริ คงแสงดาว และ จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์. 2548. ศึกษาชนิดวัชพืชสำคัญในหน่อไม้ฝรั่ง. เอกสารไม่ได้ตีพิมพ์ (4 หน้า). กลุ่มวิจัยวัชพืช, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
6. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการสมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.
7. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการสมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.

8. Anonymous, 1982. Weed Surveying Technique. Paper in ASEAN Planti Advance Course on Weed Identification. 6-25 June 1982. ASEAN PLANTI Quarantine Centre and Training Institute, Malaysia. 20 pp.

9. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.

10. Haffiger, E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1.CIBA–GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.

11. Haffiger,E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA– EIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.

12. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.

13. http://it.doa.go.th/vichakan/news.phy?newsid=5

14. http://production.doae.go.th

15. http://www.ku.ac.th/e-magazine/feb 49/agri/spear.htm.

16. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.

17. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.

18. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

ตารางที่ 1ค่า Relative density (RD)Relative frequency (RF) และ Sum Dominance Ratio (SDR)ของวัชพืชในพื้นที่ปลูกหน่อไม้ฝรั่ง

	ชนิดวัชพืช		วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
1	แห้วหมู	*Cyperus rotundus* L.	Cyperaceae	S	29.9	8.7	19.3
2	หญ้าตีนนก	*Digitaria ciliaris* (Resz.) Koel.	Poaceae	N	6.8	10.1	8.4
3	หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa colona* (L.) Link.	Poaceae	B	5.4	7.4	6.4
4	ผักขม	*Amaranthus viridis* L.	Amaranthaceae	B	6.3	6.2	6.2
5	น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* L.	Euphorbiaceae	B	4.4	7.4	5.9
6	ผักเบี้ยใหญ่	*Portulaca oleracea* L.	Portulacaceae	B	4.8	6.2	5.5
7	ผักเบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrum* L.	Aizoaceaee	B	4.2	6.0	5.1
8	หญ้าตีนกา	*Eleusine indica* L. Gaertn.	Poaceae	N	3.5	3.2	3.3
9	หญ้าตอแหล	*Leptochloa panicea* (Retz.) Ohwi.	Poaceae	N	2.9	3.6	3.3
10	หญ้าปากควาย	*Dactylocthenium aegyptium* (L.) P.B.	Poaceae	N	2.7	3.2	2.9
11	หญ้าหางนกยูงใหญ่	*Arachne racemosa* Ohwi.	Poaceae	N	3.5	2.0	2.8
12	หญ้าดอกขาว	*Leptochloa chinensis* (L.) Ness.	Poaceae	N	2.4	3.0	2.7
13	หญ้าตีนติด	*Brachiaria reptans* (L.) Gard & Hubb.	Poaceae	N	1.7	3.4	2.5
14	หญ้ายาง	*Euphorbia heterophylla* L.	Euphorbiaceae	B	2.1	2.6	2.4
15	ผักขมหิน	*Boerhavia diffusa* (L.)	Nyctaginaceae	B	2.5	2.0	2.3
16	สร้อยนกเขา	*Mollugo penthaphylla* L.	Aizoaceae	B	2.5	1.6	2.1
17	กะเม็ง	*Eclipta alba* L.	Asteraceae	B	1.7	2.2	1.9
18	ผักเสี้ยนผี	*Cleome viscosa L.*	Capparidaceae	B	1.0	1.4	1.2
19	หญ้าละออง	*Vernonia cinerea*(L.)Less.	Asteraceae	B	0.8	1.4	1.1
20	พรมพระอินทร์	*Portulaca quadrifida* L.	Portulacaceae	B	0.5	1.6	1.0
21	ผักเสี้ยนดอกขาว	*Cleome gynandra* L.	Capparidaceae	B	1.9	0.2	1.0
22	หญ้าแพรก	*Cynodon dactylon* (L.)Pers.	Poaceae	N	1.0	1.0	1.0
23	เงี่ยงปา	*Lindernia ciliata* Pernel	Scrophulariaceae	B	1.0	1.0	1.0
24	เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia* L.	Sterculiaceae	B	0.4	1.0	0.7

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
25	ตีนตุ๊กแก	*Tridax procumbens* L.	Asteraceae	B	0.4	1.0	0.7
26	เทียนนา	*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell	Onagraceae	B	0.4	1.0	0.7
27	หนวดปลาดุก	*Fimbristylis miliacea* (L.) Vahl.	Cyperaceae	S	0.4	0.8	0.6
28	หญ้าดอกชมพู	*Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E.Hubb.	Poaceae	N	0.3	0.8	0.6
29	กกสามเหลี่ยมใหญ่	*Cyperus sp.*	Cyperaceae	S	0.3	0.8	0.5
30	หูปลาช่อน	*Emilia sonchifolia (L.) DC.*	Asteraceae	B	0.5	0.6	0.5
31	หญ้ารังนก	*Chloris barbata* Sw.	Poaceae	N	0.2	0.6	0.4
32	ต้อยติ่ง	*Ruellia tuberose* L.	Acanthaceae	B	0.1	0.4	0.3
33	ผักคราดหัวแหวน	*Spilanthes paniculata* Wall.ex DC.	Asteraceae	B	0.1	0.4	0.3
34	สาบแร้งสาบกา	*Ageratum conyzoides* L.	Asteraceae	B	0.1	0.4	0.3
35	ขี้ไก่ย่าน	*Mikania micrantha* H.B.K.	Asteraceae	B	0.1	0.4	0.2
36	ถั่วลิสงนา	*Alysicarpus vaginalis* (L.)DC.	Papilionoideae	B	0.1	0.4	0.2
37	หญ้ากาบหอย	*Lindernia crustacea* (L.) F.Muell.	Scrophulariaceae	B	0.1	0.4	0.2
38	กกขนาก	*Cyperus difformis* L.	Cyperaceae	S	0.2	0.2	0.2
39	ตำแย	Laportea bulbifera (Siebold&Zucc.)Wedd.	Urticaceae	B	0.1	0.2	0.1
40	โทงเทง	*Physalis minima* L.	Solanaceae	B	0.1	0.2	0.1
41	ผักบุ้ง	*Ipomoea aquatica Forsk.*	Convolvulaceae	B	0.1	0.2	0.1
42	ผักปลาบ	*Commelina diffusa* Burm.f.	Commelinaceae	B	0.1	0.2	0.1
43	บานไม่รู้โรยป่า	*Gomphrena celosioides* Mart.	Amaranthaceae	B	0.0	0.2	0.1
44	ปอวัชพืช	*Corchorus olitorius* L.	Tiliaceae	B	0.0	0.2	0.1
45	ผักแครด	*Synedrella nodriflora* (L.)Gaertn.	Asteraceae	B	0.0	0.2	0.1
46	ผักปลาบ	*Commelina benghalensis* L.	Commelinaceae	B	0.0	0.2	0.1
47	มะระขี้นก	*Momondica charantin* L.	Cucurbitaceae	B	0.0	0.2	0.1
48	ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus amarus* Schumach et Thonn.	Euphorbiaceae	B	0.0	0.2	0.1

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
49	สะอึก	*Ipomoea gracilis* R.H.	Convolvulaceae	B	0.0	0.2	0.1
50	สาบเสือ	*Chromolaena odoratum* (L.)R.M.King&H.Robinson	Asteraceae	B	0.0	0.2	0.1
51	โสนคางคก	*Aeschynomene aspera* L.	Papilionoideae	B	0.0	0.2	0.1
52	โสนดอน	*Aeschynomene americana* L.	Papilionoideae	B	0.0	0.2	0.1
53	หญ้าแดง	*Ischaemun rugosum* Salisb.	Poaceae	N	0.0	0.2	0.1
54	อุตพิต	*Typhonium triobatum* (L.)Shott.	Araceae	B	0.0	0.2	0.1
55	หญ้าลิ้นงู	*Hedyotis corymbosa Willd.*	Rubiaceae	B	0.0	0.2	0.1
56	ครอบฟันสี	*Abutiton indicum* Sweet.	Malvaceae	B	0.0	0.0	0.0
57	ตดหมูตดหมา	*Paederia linearis* Hook L.	Rubiaceae	B	0.0	0.0	0.0
58	ตำลึง	*Coccinia grandis* (L.) Voigt	Cucurbitaceae	B	0.0	0.0	0.0
59	ผักเสี้ยนดอกม่วง	*Cleome rutidospema* DC.	Capparidaceae	B	0.0	0.0	0.0
60	หญ้าไข่เหา	*Eragrostis ciliata* (Roxb.) Ness	Poaceae	N	0.0	0.0	0.0

1 : B = วัชพืชประเภทใบกว้าง N = วัชพืชประเภทใบแคบ S = วัชพืชประเภทกก

2 : RD = Relative density

3 : RF = Relative frequency

4 : SDR = Sum Dominance Ratio

การศึกษาชนิดวัชพืชในพืชส่งออก : ถั่วลันเตา

Study on Weed Species in Exported Crops : *Pisum sativum* L.

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์[1] เบญจมาภรณ์ ลิ้มประเสริฐ[2] มัตติกา ทองรส[3]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2]สำนักการเกษตรอำเภอดำเนินสะดวก [3]สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

บทคัดย่อ

การสำรวจและศึกษาชนิดวัชพืชในแหล่งปลูกถั่วลันเตาได้ดำเนินงานในพื้นที่ปลูกถั่วลันเตา ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณภาคเหนือของประเทศไทย คือที่จังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และน่าน ช่วงระยะเวลาดำเนินงานตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2552 ทำการสำรวจชนิดและปริมาณวัชพืช โดยใช้แปลงสุ่ม (sampling plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี unrestricted sampling method พบวัชพืชทั้งหมด 44 ชนิด จำแนกได้ 19 วงศ์ (family) 49 สกุล (genus) 44 พันธุ์ (species) วัชพืชชนิดที่พบในปริมาณมาก และพบบ่อยครั้งในการสำรวจมากที่สุดจะเป็นวัชพืชเด่น (dominant species) โดยพิจารณาจากค่า sum dominance ratio (SDR) ซึ่งได้แก่ สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* L.) มีค่า SDR เท่ากับ 22.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวัชพืชเด่นลำดับรอง พบ 4 ชนิดคือ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* L.) Gaertn. ส้มกบ (*Oxalis corriculata* L.) หญ้าตีนนก (*Digitaria adscendens* (L.) Scop. และหญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colona* (L.) Link..มีค่า SDR เท่ากับ 13.5, 9.8, 8.5 และ 6.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ชนิดวัชพืชที่รวบรวมได้ในครั้งนี้สามารถนำไปจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชตามหลักสากล เตรียมส่งให้ประเทศคู่ค้าในกรณีที่มีการร้องขอจากประเทศที่นำเข้าถั่วลันเตา หรือในกรณีการเจรจาขอเปิดตลาดใหม่ ตามข้อตกลงสุขอนามัยพืช (SPS Agrement) นอกจากนี้ยังใช้เป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูล และการจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป

รหัสโครงการวิจัย 07 01 49 07

คำนำ

ถั่วลันเตา (Pisum sativum L.) มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศเอธิโอเปีย เป็นพืชฤดูเดียว ลำต้นเล็กเป็นเหลี่ยม เลื้อยทอด ใบเป็นใบย่อย 3 ใบ ปลายใบเปลี่ยนเป็นมือเกาะ ดอกสีขาว/ม่วง เป็นแบบสมบูรณ์เพศ ถั่วลันเตาแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทฝักเหนี่ยว และแข็ง เมล็ดโต นิยมปลูกเพื่อรับประทานเมล็ด มีชื่อสามัญเรียกว่า sugar snap pea ถั่วลันเตาอีกประเภทมีขนาดของฝักใหญ่กว่า และที่ฝักมีปีก ปลูกเพื่อใช้รับประทานฝักสด มีชื่อสามัญว่า garden pea (http://www.vegetweb.com/content/ถั่วลันเตา) ในถั่วลันเตาจะมีเบตาแคโรทีนสูง นอกจากนี้มีแร่ธาตุหลายอย่างเช่น แคลเซี่ยม และฟอสฟอรัส (http://fruits 2you.com)

ถั่วลันเตาเป็นพืชที่ชอบอากาศเย็น จึงนิยมปลูกในช่วงปลายฝน หรือต้นหนาว อุณหภูมิที่เหมาะสม 13-18 องศาเซลเซียส พื้นที่ปลูกถั่วลันเตาในประเทศไทยส่วนใหญ่จึงอยู่ที่ภาคเหนือตอนบนเช่นที่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และลำปาง ภาคเหนือตอนล่างเช่นที่จังหวัดเพชรบูรณ์ ตาก และ ภาคตะวันตกที่จังหวัดกาญจนบุรี ส่วนใหญ่เป็นการปลูกในฤดูหนาว การปลูกนอกฤดูเช่น ในฤดูฝนจะปลูกที่ภาคเหนือตอนล่างบริเวณพื้นที่เขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ และอำเภอพบพระ จังหวัดตาก พันธุ์ที่ส่งเสริมให้ปลูกมี 3 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ฝาง 7 ซึ่งเป็นพันธุ์ฝักใหญ่ ส่วนพันธุ์ฝักเล็กคือพันธุ์เอ็ม เอส 12 และ เอ็ม เจ 55 (http://www.nautilus.cc.th/neath-nutrition/herb-freshbeans.asp.)

ถั่วลันเตาเป็นพืชผักและผลิตภัณฑ์ผักแปรรูปส่งออกที่สำคัญชนิดหนึ่ง มีการส่งออกในรูปของผักแช่แข็งอยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวโพดหวาน กระเจี๊ยบ ตลาดที่สำคัญคือ ญี่ปุ่น สหราชอาณาจักร สหรัฐอเมริกา สวีเดน และไต้หวัน และส่งในรูปแบบของผักแช่เย็น ตลาดส่งออกถั่วลันเตาส่วนใหญ่จะอยู่ในประเทศแถบเอเชีย เช่นประเทศญี่ปุ่น มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน (http://www.ryt9.com/s/ryt9/273572)

ตามข้อตกลงมาตรการสุขอนามัยพืช (SPS Agrement) นั้น การส่งออกหรือการขอเปิดตลาดสินค้าเกษตรนั้น ประเทศสมาชิกจะต้องเตรียมข้อมูลด้านหนึ่งเกี่ยวกับบัญชีรายชื่อศัตรูพืชของประเทศผู้ส่งออก ส่งให้ประเทศผู้นำเข้าเพื่อประกอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) ซึ่งอาจจะเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช หรือวัชพืชซึ่งอาจติดมากับสินค้าที่นำเข้า ทั้งนี้เพื่อเป็นการปกป้องอันตรายหรือความเสียหายจากศัตรูดังกล่าวอันจะเกิดกับสุขภาพมนุษย์ สัตว์ และ สิ่งแวดล้อมของประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตร ดังนั้นสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงได้จัดทำกิจกรรมย่อย การศึกษาศัตรูพืชในประเทศเพื่อการค้าระหว่างประเทศ และการศึกษาชนิดวัชพืชในพืชส่งออก(ถั่วลันเตา) ก็เป็นหนึ่งการทดลองที่อยู่ในกิจกรรมย่อยดังกล่าว สำหรับการสำรวจชนิดวัชพืชในถั่วลันเตานั้น ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการสำรวจเป็นเอกสารวิชาการเกี่ยวกับการแพร่กระจายของวัชพืชในแปลงปลูกถั่วลันเตา ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจสามารถนำไป

จัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List) เพื่อส่งให้ประเทศผู้นำเข้าเมื่อมีการร้องขอ หรือเป็นเอกสารประกอบการขอเปิดตลาด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แปลงสุ่ม (Sample Plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร
- เลนส์ขยาย และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องตา
- กล้องบันทึกภาพ
- วัสดุ และอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเช่น กรรไกร ถุงพลาสติก เฟรมอัดตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์/กระดาษฟาง กระดาษลูกฟูก และเชือกหรือสายรัด
- อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูล เช่น กระดาษ หรือแบบฟอร์มในการบันทึกข้อมูล
- เอกสารและตำราประกอบการจำแนกและระบุชื่อพืช

วิธีการ

1. การค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลวิชาการ

ค้นคว้าเอกสารวิชาการต่าง ๆ เกี่ยวกับถั่วลันเตา เช่น แหล่งปลูก ชนิดและพันธุ์ การปลูก การจัดการศัตรูพืช และการแพร่ระบาดของวัชพืช เป็นต้น

2. การสำรวจ และรวบรวมชนิดวัชพืช

เนื่องจากถั่วลันเตาเป็นพืชที่ชอบอากาศเย็น ดังนั้นพื้นที่ปลูกจึงอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทย การสำรวจวัชพืชในพื้นที่ปลูกถั่วลันเตาจึงเน้นแหล่งปลูกดังกล่าวข้างต้นคือ **ภาคเหนือ** : จังหวัด ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย น่าน และ อุตรดิตถ์ **ภาคตะวันตก** : จังหวัดตาก และกาญจนบุรี

วิธีสุ่มตัวอย่างวัชพืชในการสำรวจนั้นใช้แปลงสุ่ม (sample plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี unrestricted sampling method (Anonymous, 1982) ทำการสุ่ม 4 จุดต่อหนึ่งแปลง บันทึกจำนวนชนิด นับปริมาณวัชพืชแต่ละชนิด และหาชื่อวัชพืช บันทึกภาพ เก็บตัวอย่างวัชพืชที่สมบูรณ์ คือมีส่วนของราก ต้น ใบ และดอก อัดไว้ในแผงไม้ เพื่อนำมาตากแห้ง รวมถึงการเก็บเมล็ดที่สมบูรณ์ และเก็บรักษาไว้ที่ห้องเก็บตัวอย่างพรรณไม้ เพื่อใช้ในการศึกษาและเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลต่อไป ส่วนการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative characteristic) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงเพื่อจัดลำดับวัชพืชเด่น (dominant species) และวัชพืชรอง (co-dominant species) นั้นได้อาศัยค่าของ sum dominance ratio ซึ่งคำนวณได้จากค่า relative density และค่า relative frequency จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Relative density (RD)} = \frac{\text{Density for a species x 100}}{\text{Total density for all species}}$$

$$\text{Relative frequency (RF)} = \frac{\text{Frequency value for a species x 100}}{\text{Total frequency value for all species}}$$

$$\text{Sum dominant ratio (SDR)} = \frac{\text{RD + RF}}{2}$$

การจัดหมวดหมู่ (classification) และการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ (identification) นั้นได้อาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของนักวิชาการและเอกสารวิชาการดังต่อไปนี้

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.
2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.
3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.
4. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.
5. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.
6. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.
7. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.
8. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.
9. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.
10. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.

11. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาในการดำเนินงาน ตั้งแต่สืบค้นข้อมูล วางแผนการสำรวจ และสำรวจวัชพืชในพื้นที่ปลูกถั่วลันเตา และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช และเมล็ดเพื่อจัดทำตัวอย่างแห้ง ได้ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือน กันยายน พ.ศ. 2552

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

ถั่วลันเตา เป็นพืชที่ปลูกกันไม่แพร่หลายเท่าใด ตามท้องตลาดมีจำหน่ายมากมาย เหตุผลหนึ่งคือถั่วลันเตาเป็นพืชที่ปลูกค่อนข้างยาก ต้องการการดูแล รักษา และเอาใจใส่ค่อนข้างมาก อีกทั้งเป็นพืชที่ชอบอากาศเย็น จึงปลูกได้ดีในช่วงฤดูหนาว ดังนั้นในการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกถั่วลันเตา จึงมีพื้นที่ดำเนินงานเฉพาะภาคเหนือของประเทศเท่านั้น

พันธุ์ถั่วลันเตาที่เกษตรกรนิยมปลูกมีหลายพันธุ์ เช่นพันธุ์แม่โจ้ 1 พันธุ์แม่โจ้ 2 พันธุ์ฟาง 7 พันธุ์ฝักใหญ่เชียงราย และพันธุ์ฝักเล็กเชียงราย เป็นต้น การปลูกถั่วลันเตานั้น เกษตรกรจะยกร่องขนาดแปลงปลูกกว้าง 150 เซนติเมตร มีร่องระหว่างแปลงกว้าง 50 เซนติเมตร ปลูกเป็น 2 แถว บนสันร่อง ระยะระหว่างแถว 100 เซนติเมตร ระหว่างต้น 30 เซนติเมตร ปลูกหลุมละ 2 ต้น ปักค้างไม้ไผ่ตรงกลางร่องปลูก ใช้เชือกฟางหรือเชือกไนล่อนซึ่งตรงกลางร่องทำค้างให้ต้นถั่วลันเตายึดเกาะเมื่อต้นถั่วทอดยอด

มีรายงานศัตรูของถั่วลันเตาทั้งโรคพืช แมลง และวัชพืช โรคพืชที่สำคัญได้แก่โรคเหี่ยว โรคราแป้ง สำหรับแมลงพบหนอนแมลงวันเจาะต้นถั่ว หนอนเจาะฝักถั่วลายจุด และหนอนผีเสื้อสีน้ำเงิน ส่วนวัชพืชที่พบในแปลงถั่วลันเตามีทั้งวัชพืชฤดูเดียว เช่น หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนติด หญ้าปากควาย หญ้าไม้กวาด หญ้ายาง เทียนนา หญ้ากำมะหยี่ ผักเบี้ยหิน ผักเบี้ยใหญ่ ผักขม สาบแร้งสาบกา กกทราย และหนวดปลาดุก ส่วนวัชพืชข้ามปีได้แก่ แห้วหมู

การป้องกันกำจัดวัชพืช ควรกำจัดขณะวัชพืชยังเล็ก โดยการถอนพรวน หรือถากดินตื้น ๆ การใช้สารกำจัดวัชพืชนั้นควรใช้อย่างระมัดระวัง และเลือกใช้สารที่เหมาะตามคำแนะนำ เช่น อะลาคลอร์, เมโทลาคลอร์ และออกซีฟลูออเฟน เป็นต้น (http://www.doa.go.th/library/htm/detail/vegetable/tourlantao/toulantao-index.html)

อย่างไรก็ตามปัญหาของวัชพืชในแปลงถั่วลันเตานั้น ส่วนใหญ่จะพบไม่มากนัก ทั้งนี้เนื่องจากเกษตรกรมีการดูแลแปลงดีและสม่ำเสมอ และประกอบกับพื้นที่ปลูกของเกษตรกรแต่ละไม่มาก จึงดูแลได้ทั่วถึง

จากการสำรวจวัชพืชในแปลงถั่วลันเตาตามแผนและพื้นที่ที่กำหนดดังกล่าวข้างต้น พบวัชพืชทั้งหมด 44 ชนิด จำแนกได้ 18 วงศ์ (family) 37 สกุล (genus) 44 พันธุ์ (species) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่า RD RF และ SRD ของวัชพืชแต่ละชนิด เพื่อนำมาเป็นตัวกำหนดในการแบ่งกลุ่มวัชพืชตามปริมาณของวัชพืชที่พบในแปลงสำรวจ ตามตารางที่ 1 สามารถแบ่งวัชพืชได้ 4 กลุ่มคือ

1. กลุ่มวัชพืชเด่น (dominant species) เป็นชนิดวัชพืชที่พบในปริมาณมาก และสำรวจพบบ่อยครั้ง ทำให้ได้ค่า SDR สูงที่สุดได้แก่ สาบแร้งสาบกา มีค่า SDR 22.3 เปอร์เซ็นต์

2. กลุ่มวัชพืชเด่นลำดับรอง (co-dominant species) พบ 4 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนกา ส้มกบ หญ้าตีนนก และหญ้านกสีชมพู มีค่า SDR 13.5, 9.8, 8.5 และ 6.7เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3. กลุ่มวัชพืชที่พบระดับปานกลางมีจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ ผักขม ผักขมหนาม แห้วหมู ปีกนกไส้ กะเม็ง ผักเบี้ยหิน กระชับ ส้มกบ(ดอกชมพู) กระดุมใบเล็ก ผักปลาบใบยาว หญ้าคออ่อน หญ้าไข่เหา และเงี่ยงป่า มีค่า SDR ตั้งแต่ 1-3.8 เปอร์เซ็นต์

4. กลุ่มวัชพืชที่พบระดับน้อยมีค่า SDR ต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีทั้งหมด 26 ชนิด ได้แก่ ผักปลาบ หญ้าแพรก บานไม่รู้โรยป่า บัวบก หญ้ากาบหอย จ้อล่อ หญ้าเกล็ดหอย ทหารกล้า กกสามเหลี่ยมใหญ่ ผักแครด ผักเสี้ยน(ดอกม่วง) หญ้ายาง ค้อนกลอง น้ำนมราชสีห์ ไมยราบ กกดอกตุ้ม ผักคราดหัวแหวน เซ่งใบมน เทียนนา ตำแย ผักกะสัง ลูกใต้ใบ แว่นแก้ว หงอนไก่ป่า สร้อยนกเขา และหญ้างวงช้าง

นอกจากการจัดแบ่งกลุ่มวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงถั่วลันเตาเป็นวัชพืชทั้ง 4 กลุ่มข้างต้นแล้วยังสามารถจัดแบ่งวัชพืชโดยยึดลักษณะขนาดความกว้างของใบ เพื่อให้สอดคล้องกับประสิทธิภาพ หรือคุณสมบัติการทำลายวัชพืชของสารกำจัดวัชพืชซึ่งสามารถแบ่งได้ ดังนี้ (ตามตารางที่ 1)

1. วัชพืชใบกว้าง เป็นวัชพืชที่มีขนาดใบกว้าง มีรูปร่างใบหลายแบบเช่น รูปไข่ รูปกลม หรือรูปเหลี่ยม เป็นต้น พบทั้งหมด 36 ชนิด เป็นวัชพืชในวงศ์ Asteraceae, Oxalidaceae, Amaranthaceae, Aizoaceae, Rubiaceae, Commelinaceae, Scrophulariaceae, Caryophyllaceae, Capparidaceae, Euphorbiaceae, Mimosoideceae, sterculiaceae, Onagraceae, urticaceae, Piperaceae, Umbeliferae และ Boraginaceae

2. วัชพืชใบแคบ เป็นกลุ่มที่มีความกว้างของใบแคบกว่าใบกว้าง รูปร่างใบแคบเรียวยาว เป็นวัชพืชในวงศ์ Poaceae ทั้งหมด ลำต้นมีข้อปล้อง ใบมีส่วนของแผ่นใบและกาบใบ การเรียงของใบเป็น 2 แถว พบทั้งหมด 5 ชนิด

3. วัชพืชพวกกก มีรูปร่างของใบแคบเรียวยาวคล้ายใบแคบ แต่ต้นไม่มีข้อปล้อง มีการเรียงของใบเป็น 3 แถว พบทั้งหมด 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Cyperaceae

สรุปวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงถั่วลันเตารายจังหวัด ดังนี้

1. วัชพืชที่สำรวจพบในแปลงถั่วลันเตาที่จังหวัดเชียงใหม่ทั้งหมด 41 ชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา หญ้าตีนกา ส้มกบ หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม ผักขมหนาม แห้วหมู ปีกนกไส้ กะเม็ง ผักเบี้ยหิน กระชับ ส้มกบ(ดอกชมพู) กระดุมใบเล็ก ผักปลาบ หญ้าคออ่อน หญ้าไข่เหา เงี่ยงปา ผักปลาบ บานไม่รู้โรยป่า บัวบก หญ้ากาบหอย จ้อล่อ หญ้าเกล็ดหอย ทหารกล้า กกสามเหลี่ยมใหญ่ ผักแครด ผักเสี้ยน(ดอกม่วง) หญ้ายาง ค้อนกลอง น้ำนมราชสีห์ ไมยราบ กกดอกตุ้ม ผักแครดหัวแหวน เซ่งใบมน เทียนนา ตำแย ผักกะสัง ลูกใต้ใบ หงอนไก่ป่า และสร้อยนกเขา

2. วัชพืชที่สำรวจพบในแปลงถั่วลันเตาที่จังหวัดน่าน ทั้งหมด 29 ชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา หญ้าตีนกา ส้มกบ หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู ผักขม ผักขมหนาม แห้วหมู กะเม็ง ผักเบี้ยหิน กระชับ กระดุมใบใหญ่ ผักปลาบ เงี่ยงปา หญ้าแพรก บัวบก หญ้ากาบหอย กกสามเหลี่ยมใหญ่ ผักแครด ผักเสี้ยน(ดอกม่วง) ค้อนกลอง น้ำนมราชสีห์ เทียนนา ตำแย ลูกใต้ใบ แว่นแก้ว หงอนไก่ป่า สร้อยนกเขา และ หญ้างวงช้าง

รายงานการศึกษาชนิดวัชพืชในแปลงถั่วลันเตาในครั้งนี้ สามารถนำไปจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชในถั่วลันเตาเพื่อเสนอให้ประเทศคู่ค้าในกรณีที่มีการร้องขอ หรือในกรณีที่เจรจาขอเปิดตลาดใหม่ นอกจากนี้ยังได้รวบรวมตัวอย่างต้นและเมล็ดวัชพืชเพื่อจัดทำเป็นตัวอย่างแห้ง เป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูลด้านวัชพืช รวมถึงการบันทึกภาพส่วนต่างๆของวัชพืช เพื่อจัดพิมพ์เป็นเอกสารวัชพืชต่อไป

สรุปผลการศึกษาและคำแนะนำ

1. การศึกษาชนิดวัชพืชในแปลงปลูกถั่วลันเตาในประเทศไทย พบวัชพืชทั้งสิ้น 44 พันธุ์ (species) จำแนกได้ 19 วงศ์ (family) 40 สกุล (genus) ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลในการจัดทำบัญชีรายชื่อวัชพืชในถั่วลันเตาเพื่อส่งให้ประเทศคู่ค้าในการส่งออกถั่วลันเตา หรือในกรณีที่ขอเปิดตลาดใหม่

2. วัชพืชเด่นจากการสำรวจในครั้งนี้มีเพียง 1 ชนิด คือ สาบแร้งสาบกา และวัชพืชเด่นลำดับรองมี 4 ชนิดคือ หญ้าตีนกา ส้มกบ หญ้าตีนนก และหญ้านกสีชมพู

3. สามารถจำแนกวัชพืชที่พบโดยอาศัยขนาดและรูปร่างของใบ ได้ 3 กลุ่ม คือกลุ่มวัชพืชใบกว้างพบ 36 ชนิด วัชพืชใบแคบ 5 ชนิด และพวกกก 3 ชนิด ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชให้มีประสิทธิภาพ

4. ได้ตัวอย่างวัชพืช จัดทำเป็นพรรณไม้แห้ง รวมถึงเมล็ด เพื่อเป็นหลักอ้างอิง และการศึกษาทางด้านวัชพืช

เอกสารอ้างอิง

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.
2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.
3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.
4. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.
5. Anonymous, 1982. Weed Surveying Technique. Paper in ASEAN Planti Advance Course on Weed Identification. 6-25 June 1982. ASEAN PLANTI Quarantine Centre and Training Institute, Malaysia. 20 pp.
6. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.
7. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.
8. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.
9. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.
10. http:/fruits 2 you.com.
11. http://www.doa.go.th/library/htm/detail/vegetable/tourlantao/toulantao _index.html
12. http:/www.nautilus.ccth/neath_nutrition/herb-freshbeans.asp.
13. http:/www.rytg.com/s/ryt 9/2 73572
14. http://www.vegetweb.com/content/ถั่วลันเตา

15. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.

16. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.

17. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

ตารางที่ 1 ค่า Relative density (RD), Relative frequency (RF) และ Sum Dominance Ratio (SDR) ของวัชพืชในพื้นที่ปลูกถั่วลันเตา

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
1	สาบแร้งสาบกา	*Ageratum conyzoides* L.	Asteraceae	B	31.5	13.1	22.3
2	หญ้าตีนกา	*Eleusine indica(* L.) Gaertn.	Poaceae	N	16.9	10.1	13.5
3	ส้มกบ	*Oxalis corniculata* L.	Oxalidaceae	B	10.0	9.5	9.8
4	หญ้าตีนนก	*Digitaria adscendens*(L.)Scop.	Poaceae	N	11.1	6.0	8.5
5	หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa colona* (L.)Link.	Poaceae	N	5.7	7.7	6.7
6	ผักขม	*Amaranthus viridis* L.	Amaranthaceae	B	2.3	5.4	3.8
7	ผักขมหนาม	*Amaranthus spinosus* L.	Amaranthaceae	B	3.0	4.2	3.6
8	แห้วหมู	*Cyperus rotundus* L.	Cyperaceae	S	2.2	4.2	3.2
9	ปีกนกไส้	*Biden pilosa* L.	Asteraceae	B	3.5	1.8	2.7
10	กะเม็ง	*Eclipta alba* L.	Asteraceae	B	1.2	3.6	2.4
11	ผักเบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrum* L.	Aizoaceae	B	1.7	3.0	2.3
12	กระชับ	*Xanthium strumarium* L.	Asteraceae	B	1.0	2.4	1.7
13	ส้มกบ ดอกชมพู	*Oxalis latifolia* H.B.K.	Oxalidaceae	B	1.5	1.8	1.6
14	กระดุมใบเล็ก	*Borreria laevis (Lamk.)Griseb.*	Rubiaceae	B	0.9	1.8	1.4
15	ผักปลาบ	*Commelina diffusa Burm.f.*	Commelinaceae	B	0.8	1.8	1.3
16	หญ้าคออ่อน	*Crassocephalum crepidioides* (Benth.)S.Moore.	Asteraceae	B	0.6	1.8	1.2
17	หญ้าไข่เหา	*Eragrostis ciliata* (Roxb.) Ness	Poaceae	N	0.4	1.8	1.1
18	เงี่ยงปา	*Lindernia ciliata* Pernel	Scrophulariaceae	B	0.2	1.8	1.0
19	ผักปลาบ	*Commelina benghalensis* L.	Commelinaceae	B	0.6	1.2	0.9
20	หญ้าแพรก	*Cynodon dactylon (L.)Pers.*	Poaceae	N	0.6	1.2	0.9
21	บานไม่รู้โรยป่า	*Gomphrena celosioides* Mart.	Amaranthaceae	B	1.0	0.6	0.8
22	บัวบก	*Centella asiatica* Urban.	Umbeliferae	B	0.4	1.2	0.8
23	หญ้ากาบหอย	*Lindernia crustacia* (L.) F.V.M.	Scrophulariaceae	B	0.3	1.2	0.7
24	จ้อล่อ	*Conyza sumatrensis* (Retz.) Walker.	Asteraceae	B	0.3	1.2	0.7

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
25	หญ้าเกล็ดหอย	*Dymaria cordata* (L.)Willd.ex.R.&S.	Caryophyllaceae	B	0.3	1.2	0.7
26	ทหารกล้า	*Galingsoga parviflora* Cav.	Asteraceae	B	0.2	1.2	0.7
27	กกสามเหลี่ยมใหญ่	*Cyperus* sp.	Cyperaceae	S	0.2	1.2	0.7
28	ผักแครด	*Synedrella nodiflora* (L.)Gaertn.	Asteraceae	B	0.2	1.2	0.7
29	ผักเสี้ยน (ดอกม่วง)	*Cleome rutidospema* DC.	Capparidaceae	B	0.2	1.2	0.7
30	หญ้ายาง	*Euphorbia heterophylla* L.	Euphorbiaceae	B	0.1	1.2	0.7
31	ค้อนกลอง	*Sphaeranthum africanus* L.	Asteraceae	B	0.2	0.6	0.4
32	น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* L.	Euphorbiaceae	B	0.2	0.6	0.4
33	ไมยราบ	*Mimosa pudica* L.	Mimosoideae	B	0.2	0.6	0.4
34	กกดอกตุ้ม	*Cyperus killingia* Endl.	Cyperaceae	S	0.1	0.6	0.4
35	ผักคราดหัวแหวน	*Spiranthes paniculata* Wall. Ex DC.	Asteraceae	B	0.1	0.6	0.4
36	เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia* L.	Sterculiaceae	B	0.1	0.6	0.3
37	เทียนนา	*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell	Onagraceae	B	0.1	0.6	0.3
38	ตำแย	Laportea bulbifera (Siebold&)	Urticaceae	B	0.1	0.6	0.3
39	ผักกระสัง	Peperomia pellucida (L.)H.B.&K.	Piperaceae	B	0.1	0.6	0.3
40	ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus amarus* Schumach et Thonn.	Euphorbiaceae	B	0.1	0.6	0.3
41	แว่นแก้ว	*Hydrocotyle umbellata* L.	Umbeliferae	B	0.1	0.6	0.3
42	หงอนไก่ป่า	*Celosia agentea* L.	Amaranthaceae	B	0.1	0.6	0.3
43	สร้อยนกเขา	*Mollugo penthaphylla* L.	Aizoaceae	B	0.1	0.6	0.3
44	หญ้างวงช้าง	*Heliotropium indicum* L.	Boraginaceae	B	0.1	0.6	0.3

1 : B = วัชพืชประเภทใบกว้าง N = วัชพืชประเภทใบแคบ S = วัชพืชประเภทกก

2 : RD = Relative density

3 : RF = Relative frequency

4 : SDR = Sum Dominance Ratio

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงเชื้อ *Spongospora subterranean* ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง

Pest Risk Analysis on *Spongospora subterranea* in Seed Potato

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์[1] วิวัฒน์ ภาณุอำไพ
ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1] วันเพ็ญ ศรีชาติ[1]
[1]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าในปี 2548-2550 ตรวจพบเชื้อ *S. subterranea* ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสก็อตแลนด์ 37 รายการ และจากออสเตรเลีย 10 รายการ เมื่อทดสอบการเกิดโรคโดยนำหัวพันธุ์มันฝรั่งที่เป็นโรคไปปลูกทดสอบที่ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิต เชียงใหม่ (ฝาง) และติดตามตรวจสอบการเกิดโรคในแปลงเกษตรกรที่ใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งที่เป็นโรค ผลการตรวจไม่พบโรคทั้งในสถานที่ทำการทดลอง และในแปลงเกษตรกร ผลการประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *S. subterranea* โดยประเมินโอกาสในการเข้ามา การตั้งรกรากอย่างถาวรและการแพร่ระบาด รวมทั้งผลกระทบทั้งทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมพบว่า เชื้อ *S. subterranea* มีศักยภาพปานกลาง-สูงในการติดเข้ามากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง โดยพิจารณาจากพื้นที่การระบาดของโรคนี้ ในประเทศที่ส่งออกหัวพันธุ์มันฝรั่งมายังประเทศไทย และคุณลักษณะของเชื้อที่มีความคงทนตลอดระยะเวลาขนส่ง แต่จากสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จึงสรุปผลการประเมินโอกาสการตั้งรกรากอย่างถาวรอยู่ในระดับต่ำ ส่วนการประเมินการแพร่ระบาดของเชื้อในประเทศไทยอยู่ในระดับปานกลาง เนื่องจากสปอร์ของเชื้อสามารถแพร่ในระยะไกลโดยติดไปกับหัวมันฝรั่งและดิน เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม ผลกระทบโดยตรงคือทำให้ผลผลิตมันฝรั่งลดลงและคุณภาพไม่เหมาะต่อการบริโภค ไม่เป็นที่ต้องการของโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนผลกระทบทางอ้อมคือ สปอร์ของเชื้อสามารถคงทนอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน ทำให้พื้นที่ที่มีการระบาดไม่สามารถปลูกมันฝรั่งได้ และใช้สารเคมีกำจัดเชื้ออาจทำให้เกิดพิษตกค้างในดินหรือสิ่งแวดล้อม จากผลการประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *S. subterranea* แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นที่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดย

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-02-01-51

กำหนดให้ประเทศที่ต้องการส่งหัวพันธุ์มันฝรั่งมายังประเทศไทยจะต้องมีการจัดการโรค powdery scab ตั้งแต่ในแปลงปลูก และในขบวนการเก็บเกี่ยวต้องมีการคัดแยกหัวที่เป็นโรค และ จะต้องมีการตรวจรับรองโดยหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบตามเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศไทย

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้ามันฝรั่งในปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี เนื่องจากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของอุตสาหกรรมแปรรูปมันฝรั่งทอดกรอบ (potato chips) ในปี พ.ศ. 2550 ประเทศไทยนำเข้ามันฝรั่งเพื่อใช้ทำพันธุ์เป็นปริมาณสูงถึง 3,600 ตัน (กรมศุลกากรม 2551)โดยนำเข้าจากสหราชอาณาจักรมากที่สุด รองลงมาคือออสเตรเลียและเนเธอร์แลนด์ การนำเข้าหัวพันธุ์ในปริมาณมากเช่นนี้เสี่ยงต่อการนำเชื้อโรคร้ายแรง จากต่างประเทศติดเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย

Spongospora subterranea เป็นสาเหตุโรค powdery scab ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของมันฝรั่งที่พบในแหล่งปลูกมันฝรั่งทั่วโลก ทั้งทวีปยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย แอฟริกา และเอเชีย แต่ยังไม่มีรายงานพบโรคนี้ในประเทศไทย (CPC,2007) เชื้อราสามารถแพร่กระจายโดยสปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัว (resting spore) ติดมากับดินหรือหัวมันฝรั่ง สปอร์สามารถพักตัวอยู่ในดินได้เป็นเวลานานจนกว่าสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะมีการสร้าง zoospore จำนวนมากเข้าทำลายราก และหัวมันฝรั่ง ทำให้เกิดอาการปุ่มปมที่รากหรือแผลสะเก็ดบนหัวมันฝรั่ง สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการแพร่ระบาดของโรค คือ อุณหภูมิประมาณ 16 – 17 องศาเซลเซียส ดินมีความชื้นสูงและระบายน้ำไม่ดี pH ในดินประมาณ 4.7-7.6 ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการกำจัดสปอร์ของเชื้อที่ติดมากับหัวมันฝรั่งหรือเชื้อที่อยู่ในดินที่ได้ผล (CPC,2007; Kole,1954; Stevenson *et al*., 2004)

ผลการตรวจศัตรูพืชในหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศพบว่ามีเชื้อ *S. subterranea* ติดมากับมันฝรั่งจากประเทศต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงของเชื้อ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดมาตรการควบคุมนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่ง โดยไม่ให้มีความเสี่ยงต่อการการที่โรคนี้จะเข้ามาระบาดในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

1. ตรวจเชื้อ *S. subterranea* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ

1.1 สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ รายการ ละ 600 หัว เพื่อตรวจหาเชื้อ *S. subterranea* ที่ติดมากับหัวมันฝรั่ง

1.2 เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่แสดงลักษณะผิดปกติมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง โดยเขี่ยผงสปอร์จากบริเวณแผลบนหัวมันฝรั่งลงบนสไลด์แก้วแล้วหยดน้ำกลั่นหรือ lactophenal แล้วปิดทับด้วย cover glass เพื่อตรวจดูสปอร์ของเชื้อ และเก็บตัวอย่างไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2. ศึกษาศักยภาพการเกิดโรค powdery scab ในสภาพแหล่งปลูกมันฝรั่งของประเทศไทย

2.1 นำหัวพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อ *S. subterranea* ไปปลูกทดสอบที่ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่(ฝาง) ในช่วงเดือนธันวาคมถึงมีนาคมโดยแบ่งเป็น 6 วิธีการๆละ 40 ต้นโดยปลูกในบ่อซีเมนต์บ่อละ 10 ต้นดังนี้

T1 หัวมันฝรั่งเป็นโรคจากออสเตรเลียคลุกแมนโคเซ็บ

T2 หัวมันฝรั่งเป็นโรคจากออสเตรเลียไม่คลุกแมนโคเซ็บ

T3 หัวมันฝรั่งเป็นโรคจากสก็อตแลนด์คลุกแมนโคเซ็บ

T4 หัวมันฝรั่งเป็นโรคจากสก็อตแลนด์ไม่คลุกแมนโคเซ็บ

T5 หัวมันฝรั่งปกติคลุกแมนโคเซ็บ

T6 หัวมันฝรั่งปกติไม่คลุกแมนโคเซ็บ

สารเคมีแมนโคเซ็บใช้อัตรา 0.4 กรัมต่อหัวมันฝรั่ง 1 กิโลกรัม

2.2 เก็บข้อมูลอุณหภูมิอากาศและอุณหภูมิดินตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง

2.3 สังเกตการณ์เกิดโรค powdery scab กับหัวมันฝรั่งที่เก็บได้โดยเปรียบเทียบระหว่างมันฝรั่งที่ปลูกจากหัวเป็นโรคและมันฝรั่งที่ปลูกจากหัวปกติ

3. ติดตามตรวจสอบการเกิดโรค powdery scab ในแหล่งปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย

3.1 ติดตามตรวจสอบโรค powdery scab ในแปลงมันฝรั่งของเกษตรกรในระยะเก็บเกี่ยวผลผลิตและที่จุดรับซื้อของบริษัท โดยเน้นเฉพาะแปลงที่ปลูกจากหัวพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศที่ตรวจพบ powdery scab และปลูกในช่วงเดือนธันวาคมถึงมกราคมเพราะเป็นระยะเวลาที่มีอุณหภูมิต่ำเหมาะแก่การเกิดโรค

3.2 เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่มีอาการผิดปกติมาตรวจในห้องปฏิบัติการต่อไป

4. วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

4.1 การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ (Initiation)

เป็นการอธิบายเหตุผลหรือเจตนารมณ์ของการวิเคราะห์ความเสี่ยงว่ามีที่มาอย่างไร

4.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Assessment)

วิเคราะห์ตามหลักการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชตามมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุข อนามัยพืช ฉบับที่ 2 แก้ไขครั้งที่ 1 เรื่องคำแนะนำสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยง

ศัตรูพืช (FAO, 2005) และมาตรฐานระหว่างประเทศสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 แก้ไขครั้งที่ 1 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกัน (FAO, 2004)

4.2.1 การจำแนกประเภทศัตรูพืช

รวบรวมข้อมูลของเชื้อ *S. subterranea* โดยเฉพาะที่เกี่ยวกับการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ ข้อมูลทางด้านชีววิทยาและความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อกำหนดสถานภาพของ *S. subterranea* ว่ามีคุณสมบัติเป็นศัตรูพืชกักกันตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 5 (ฉบับแก้ไขปรับปรุง) เรื่อง รายการคำอธิบายศัพท์บัญญัติด้านสุขอนามัยพืช (FAO,2006) ระบุไว้ว่า ศัตรูพืชกักกัน หมายถึง **ศัตรูพืชชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสำคัญทางเศรษฐกิจต่อพื้นที่ซึ่งมีปัจจัยสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญแพร่ขยายพันธุ์ โดยศัตรูพืชชนิดนี้ไม่เคยปรากฏในพื้นที่นั้น หรือปรากฏแล้วแต่ยังไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และอยู่ภายใต้การควบคุมอย่างเป็นทางการ**

4.2.2 ประเมินโอกาสการเข้ามาและแพร่ระบาด (Assessment of the probability of introduction and spread)

1) ประเมินโอกาสการเข้ามา (Probability of entry of a pest) ของ *S. subterranea* กับหัวมันฝรั่ง โดยพิจารณาจากปัจจัยดังนี้

- การระบาดของศัตรูพืชอย่างรุนแรงในแหล่งผลิต
- การจัดการศัตรูพืชในแหล่งผลิต
- ช่วงวงจรชีวิตของ *S. subterranea* ซึ่งมีโอกาสปะปนเข้ามากับหัวมันฝรั่ง ภาชนะบรรจุหรือพาหนะขนส่ง
- การรอดชีวิตของ *S. subterranea* ภายใต้สภาวะแวดล้อมขณะขนส่ง
- ความยากง่ายในการตรวจพบที่จุดนำเข้า
- ปริมาณและความถี่ที่นำเข้า

2) ประเมินโอกาสการตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of establishment) ของ *S. subterranea* ว่ามีสามารถที่จะเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ภายใต้สภาพแวดล้อมของประเทศไทย โดยอาศัยข้อมูลทางชีววิทยาของเชื้อในพื้นที่ที่เป็นแหล่งระบาดเปรียบเทียบกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย ปัจจัยที่นำมาพิจารณาได้แก่

- การมีพืชอาศัย จำนวนและชนิดพืชอาศัย
- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อม
- ความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช
- วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช

3) ประเมินโอกาสการแพร่ระบาดของ *S. subterranea* ในประเทศไทยหลังจากเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Probability of spread after establishment)

- การกระจายตัวของพืชอาศัย
- ความสามารถในการขยายพันธุ์
- วิธีการเคลื่อนย้าย วิธีการแพร่กระจาย
- ศัตรูธรรมชาติ
- สิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ

4.2.3 การประเมินผลกระทบของศัตรูพืชทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้น

1) ผลที่เกิดจากศตรูพืชโดยตรง

- ความสูญเสียของผลผลิตในแง่ปริมาณและคุณภาพ
- รูปแบบ จำนวน และความถี่ของความเสียหาย
- ค่าใช้จ่ายในการควบคุม
- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

2) ผลกระทบทางอ้อม

- ผลกระทบต่อการส่งออก รวมถึงการบังคับใช้กฎระเบียบด้านสุขอนามัยพืช
- ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นทำให้ราคาสินค้าสูงขึ้น
- ผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพอันเนื่องมาจากการป้องกันกำจัด
- ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช

4.3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

ความเสี่ยงทั้งหมดจะถูกกำหนดโดยการตรวจสอบผลลัพธ์จากการประเมินโอกาสเข้ามาเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ของศัตรูพืชและผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ กรณีที่พบความเสี่ยงอยู่ในระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ ต้องดำเนิน การจำแนกมาตรการสุขอนามัยพืชที่จะลดความเสี่ยงให้ถึงระดับที่ยอมรับได้ หรือต่ำกว่าระดับที่ยอมรับได้โดยพิจารณาจาก

- มาตรการสุขอนามัยพืชที่ใช้ต้องมีประสิทธิภาพและเป็นไปได้ในทางปฏิบัติ
- เป็นมาตรการที่เคยดำเนินการมาก่อนหรือกำลังดำเนินการอยู่และเป็นที่ยอมรับในระดับสากล
- ก่อให้เกิดผลกระทบน้อยที่สุด

มาตรการสุขอนามัยพืชที่มีการนำมาใช้ในปัจจุบัน สามารถแบ่งได้ตามสถานภาพของศัตรูพืชในเส้นทางศัตรูพืช ประกอบด้วยมาตรการ ดังต่อไปนี้

- มาตรการที่ใช้กับสินค้าโดยตรง เช่นการกำจัดศัตรูพืชกับสินค้าด้วยสารเคมี คามเย็น หรือความร้อน

- มาตรการที่ใช้เพื่อป้องกันหรือลดปริมาณการเข้าทำลายของศัตรูพืชในแหล่งผลิต เช่น กำหนดให้ต้องมีการจัดการศัตรูพืชในแปลงผลิต

- มาตรการที่ใช้เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นว่าในพื้นที่ผลิตหรือแหล่งผลิตปราศจากศัตรูพืช เช่นการนำเข้าจากแหล่งผลิตที่ปราศจากศัตรูพืช (pest free area)

- มาตรการห้ามนำเข้าสินค้า เป็นมาตรการขั้นรุนแรงที่ใช้ในกรณีที่ไม่สามารถจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

เวลาและสถานที่ทดลอง

ระยะเวลา : ตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2550

สถานที่ทดลอง : กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเชียงใหม่(ฝาง)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาเชื้อ *S. subterranea* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ

1.1 สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อตรวจโรค powdery scab (**ภาพที่ 1**) ที่ติดมากับหัวมันฝรั่ง พบหัวมันฝรั่งที่มีอาการตุ่มนูนสีน้ำตาลอมม่วงขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร ผิวหน้าปริแตก ภายในมีสปอร์ลักษณะผงละเอียดสีน้ำตาลเข้ม (**ภาพที่ 2**)

ปี 2548 สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก สก็อตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์และอิสราเอล จำนวน 48 รายการ น้ำหนัก 4,746 ตัน ตรวจพบโรค powdery scab กับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก สก็อตแลนด์ 12 รายการน้ำหนัก 1,550.5 ตัน ซึ่งมีหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีโรค powdery scab เกินจากเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์ 1 รายการน้ำหนัก 7.5 ตัน และตรวจพบโรค powdery scab กับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ออสเตรเลีย 4 รายการน้ำหนัก 164.5 ตันซึ่งมีหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีโรค powdery scab เกินจากเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่ง 1 รายการน้ำหนัก 70.5 ตัน(ตารางที่ 1)

ปี 2549 สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก สก็อตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ นิวซีแลนด์ และแคนาดา จำนวน 50 รายการ น้ำหนัก 4,300 ตัน ตรวจพบโรค powdery scab กับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก สก็อตแลนด์ 14 รายการน้ำหนัก 1,295.5 ตัน และจากหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ออสเตรเลีย 3 รายการน้ำหนัก 141 ตัน (ตารางที่ 1)

ปี 2550 สุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก สก็อตแลนด์ ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ และนิวซีแลนด์ จำนวน 37 รายการ น้ำหนัก 3,255 ตัน ตรวจพบโรค powdery scab กับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก สก็อตแลนด์ 11 รายการน้ำหนัก 1,034 ตัน ซึ่งมีหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีโรค powdery scab เกินจากเงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์ 1 รายการน้ำหนัก 141 ตัน และตรวจพบโรค powdery scab กับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ออสเตรเลียไม่เกินจากเงื่อนไขการนำเข้า 3 รายการน้ำหนัก 117.5 ตัน (ตารางที่ 1)

1.2 เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการโรคมาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบ cystosori หรือ sporeball อยู่ภายใต้สะเก็ดแผลบนหัวมันฝรั่ง cystosori มีลักษณะเป็นผงละอียด สีน้ำตาลเข้ม รูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่ค่อนข้างกลมหรือหลายเหลี่ยม ประกอบด้วย cyst จำนวนมาก **(ภาพที่** 3 **)**

จากผลการตรวจโรค powdery scab ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่า หัวพันธุ์มันฝรั่งจากแหล่งที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะต่อการระบาดของโรค เช่นสก็อตแลนด์ มีโอกาสที่โรคจะติดเข้ามาสูงกว่าประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศแห้งแล้งและอุณหภูมิค่อนข้างสูง เช่น ออสเตรเลีย หรืออิสราเอล พบว่ามีโรคติดมากับมันฝรั่งน้อยหรือไม่พบเลย ดังนั้นการตรวจศัตรูพืช ณ จุดนำเข้า ควรพิจารณาถึงแหล่งที่นำเข้าที่มีความเสี่ยงต่างกัน โดยสุ่มตรวจอย่างเข้มงวดหากหัวพันธุ์มันฝรั่งมาจากแหล่งที่มีการระบาดของโครุนแรง

2. ศึกษาศักยภาพการเกิดโรค powdery scab ในสภาพแหล่งปลูกมันฝรั่งของประเทศไทย

2.1 จากผลการทดสอบศักยภาพการเกิดโรค powdery scab โดยปลูกหัวมันฝรั่งที่เป็นโรคจากออสเตรเลีย สก็อตแลนด์ และหัวมันฝรั่งปกติ (ภาพที่ 4)โดยเปรียบเทียบระหว่างหัวมันฝรั่งที่คลุกสารเคมีแมนโคเซบและหัวมันฝรั่งที่ไม่คลุกสารเคมีพบว่า ทั้งรากและหัวมันฝรั่งที่เก็บจากทุกวิธีการไม่มีอาการโรค powdery scab หลังจากนั้นทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้งในปี 2549 และ2550 โดยใช้หัวมันฝรั่งที่เป็นโรคและหัวมันฝรั่งปกติ แต่ไม่มีการคลุกสารเคมีก่อนปลูก ผลปรากฏว่าไม่พบอาการโรค powdery scab เช่นกัน

2.2 จากการเก็บข้อมูลอุณหภูมิอากาศ อุณหภูมิดินและความชื้นในอากาศในช่วงที่ทำการทดลองพบว่าช่วงเดือนธันวาคมถึงมีนาคมมีค่าอุณหภูมิเฉลี่ย 18-24 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 89-96% ส่วนอุณหภูมิเฉลี่ยของดินในบ่อซีเมนต์ที่ทำการทดลองเฉลี่ย 15-26 องศาเซลเซียส

Kole (1954) รายงานว่าอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อยังคงสามารถทำให้เกิดโรคคือ 11 องศาเซลเซียส และ 22-25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แม้ว่าอุณหภูมิเฉลี่ยขณะที่ทำการทดลองอยู่ในช่วงที่เชื้อสามารถเข้าทำลายพืชได้ แต่โดยทั่วไปอุณหภูมิในช่วงกลางวันเฉลี่ยสูงกว่า 25 องศา

เซลเซียส อุณหภูมิในดินก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการเกิดโรค Hims (1976) รายงานว่าโรค powdery scab จะระบาดเมื่ออุณหภูมิในดินประมาณ 12-13 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิดินในบ่อที่ทดลองเฉลี่ย 15-26 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลองไม่เหมาะสมกับการเกิดโรค

3. ติดตามตรวจสอบการเกิดโรค powdery scab ในแหล่งปลูกมันฝรั่งประเทศไทย

ติดตามตรวจสอบการเกิดโรค powdery scab ในแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตกร และที่จุดรับซื้อหัวมันฝรั่งของบริษัทในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูนและตาก (ภาพที่ 5) ระหว่างปี 2548-2550 พบหัวมันฝรั่งที่มีอาการคล้ายโรค powdery scab แต่หลังจากเก็บตัวอย่างมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการพบว่าเป็นโรค common scab ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Steptomyces* sp. (ภาพที่ 6-7) และไม่พบโรค powdery scab ในทุกพื้นที่ที่สำรวจ

เกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกมันฝรั่งในช่วงเดือนธันวาคมถึงมกราคม ซึ่งมีอุณภูมิเฉลี่ยต่ำสุดและสูงสุด 19-28 องศาเซลซียส และปริมาณน้ำฝน 0.1-.09 มิลลิเมตร (จังหวัดเชียงใหม่) (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2551) โดยเฉพาะอย่างยิ่งหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสก็อตแลนด์ ซึ่งตรวจพบว่ามีโรค powdery scab ติดมา มักจะนำเข้าในช่วงเดือนธันวาคม และเริ่มปลูกปลาย เดือนธันวาคมถึงมกราคม ดังนั้นระยะที่เหมาะสมที่เชื้อจะเข้าทำลายพืชได้ดีคือระยะที่มันฝรั่งเริ่มสร้างหัวจะอยู่ในช่วงปลายเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ซึ่งอุณภูมิเริ่มสูงขึ้น ดังนั้นสภาพแวดล้อมทั้งอุณหภูมิและความชื้นในดินจึงไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค รวมทั้งการปฏิบัติของเกษตรกรซึ่งใช้สารเคมีกำจัดเชื้อรา เช่น แมนโคเซบ คลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูก ซึ่งมีรายงานว่าสามารถลดการเกิดโรคได้ (Braithwaite *et al*.,1994; Merz *et al*., 2000) และนอกจากนี้เกษตรกรมักจะปลูกมันฝรั่งสลับกับพืชที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อ จึงเป็นการตัดวงจรโรค

แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าสภาพแวดล้อมในประเทศไทยจะไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค แต่ก็มีรายงานพบโรคในประเทศเขตร้อนเช่น อิสราเอล เซาท์แอฟริกาฟิลิปปินส์ และที่รัฐ North Dakota พบโรค powdery scab ไนพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูง ปริมาณน้ำฝนน้อย และ pH ในดินสูง (*Spongospora* PIN BOARD,2000) ชี้ให้เห็นว่าเชื้อสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างได้ ประกอบกับปัญหาสภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน ทำให้สภาพอากาศเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา จึงยังคงมีความเสี่ยงที่เชื้อ *S.subterranea* จะสามารถเจริญและแพร่ขยายพันธุ์ในประเทศไทยได้

4. วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

4.1 การเริ่มขบวนการวิเคราะห์ (Initiation)

Spongospora subterranea เป็นสาเหตุโรค powdery scab ซึ่งเป็นโรคที่สำคัญของมันฝรั่งที่พบในแหล่งปลูกมันฝรั่งทั่วโลก ทั้งทวีปยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย แอฟริกา และเอเชีย เชื้อราสามารถแพร่กระจายโดยสปอร์ที่อยู่ในระยะพักตัว (resting spore) ติดมากับดินหรือหัวมันฝรั่ง (CPC, 2007 ; Stevenson *et al*., 2004) *S. subterranea* จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507เนื่องจากเป็นศัตรูพืชที่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศที่เป็นแหล่งแพร่ระบาดของโรค powdery scab จึงมีความเสี่ยงที่เชื้อ *S. subterranea* จะติดมากับหัวมันฝรั่ง และจากการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าในตั้งแต่ปี 2548-2550 ตรวจพบเชื้อ *S. subterranea* ในหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสก็อตแลนด์และออสเตรเลีย ดังนั้นจึงต้องดำเนินการประเมินความเสี่ยงที่เชื้อจะเข้ามาแพร่ระบาดทำความเสียหาย เพื่อตัดสินใจเลือกใช้มาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสมมากำกับดูแลการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศ

4.2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Assessment)

4.2.1 การจำแนกประเภทศัตรูพืช

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Spongospora subterromea f.* sp. *Subterranean*

Kingdom: Protozoa

Phylum: Plasmodiophoromycota

Class: Plasmodiophoromycetes

Order: Plasmodiophorales

Family: *Plasmodiophoraceae*

ชื่อสามัญ: Powdery scab

พืชอาศัย: *Lycopersicon esculentum (tomato),Solanum tuberosum (potato)* (CPC,2007)

แหล่งแพร่ระบาด: **Europe**

Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Czechoslovakia, Denmark, Finland France, Germany, Greece, Ireland, Italy, Malta, Netherlands, Norway Poland, Portugal, Romania, Russian, Federation, Sweden, Switzerland United Kingdom, Yugoslavia

Asia

China, Taiwan, India, Israel, Japan, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Lebanon, Nepal, Pakistan, Philippines, Sri Lanka, Turkey

Africa

Algeria, Burundi, Egypt, Kenya, Madagascar, Mauritius, Morocco, Mozambique, Rwanda

South Africa

Tanzania, Tunisia, Zimbabwe

Central America & Caribbean

Costa Rica, Panama

North America

Canada, Mexico, USA

South America

Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, Peru, Uruguay, Venezuela

Oceania

Australia, New Zealand (CPC,2007)

ชีววิทยา

S. subterranea เป็น obligate parasite เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูในรูป cystosori หรือ sporeball ซึ่งประกอบด้วย cyst จำนวนมาก cyst เป็นสปอร์อยู่ในระยะพักตัวมีผนังหนา ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี อยู่ในดินได้นานกว่า 6 ปี สามารถมีชีวิตรอดผ่านท่อทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง และจะงอกต่อเมื่อได้รับการกระตุ้นจากรากของพืชอาศัย โดยสร้างเป็น primary zoospore ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส primary zoospore สามารถเคลื่อนที่ในน้ำที่อยู่ในช่องว่างระหว่างเม็ดดินได้ในระยะ 2-3 เซนติเมตร และอาจเคลื่อนที่ไปได้มากกว่านี้ถ้าน้ำในดินไหล จากนั้นเข้าทำลายรากขนอ่อน หรือ stolon แล้วสร้าง sporangial plasmodia ซึ่งจะพัฒนาเป็น zoosporangia อยู่ภายในเซลของรากพืช ต่อมา zoosporangia จะสร้าง secondary zoospore ซึ่งสามารถเข้าทำลายรากและหัวมันฝรั่ง ทำให้เกิดอาการปุ่มปม (gall) ที่ราก หรือแผลสะเก็ด (scab) ที่หัวมันฝรั่ง แผล scab เมื่อแตกออกภายในจะเต็มไปด้วย cystosori ซึ่งสามารถหลุดออกขณะเก็บเกี่ยว และพักตัวอยู่ในดินเพื่อรอเข้าทำลายมันฝรั่งต่อไป หรือ cystosori อาจปนปื้อนไปกับหัวอื่นๆในขณะเก็บรักษา (CPC,2007; Stevenson *et al.*, 2004)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดต่อการเกิดโรคคืออุณหภูมิประมาณ 16-17 องศาเซลเซียส ดินมีความชื้นสูงหรือระบายน้ำไม่ดี pH ในดิน 4.7-7.6 และอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อยังคงสามารถทำให้เกิดโรคคือ 11 องศาเซลเซียส และ 22-25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ระยะที่มันฝรั่งอ่อนแอต่อโรคคือประมาณ 7 วันก่อนเริ่มสร้างหัว และ 21-28 วันหลังจากเริ่มสร้างหัว (de Bore, 2000; Kole,1954) นอกจากนี้ *S. subterranea* ยังเป็นพาหะนำเชื้อ *Potato mop top virus* โดยไวรัสจะติดมากับ cystosori และเข้าทำลายพืชผ่านทาง zoospore (CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004)

4.2.2 การประเมินศักยภาพการเข้ามา ดำรงชีพอย่างถาวรและการแพร่ระบาด

1) ประเมินโอกาสการเข้ามาของ *S. subterranea* กับหัวมันฝรั่ง

โอกาสการเข้ามา ปานกลาง-สูง

การระบาดของศัตรูพืชอย่างรุนแรงในแหล่งผลิต เชื้อ *S. subterranea* พบระบาดทั่วไปในพื้นที่ปลูกมันฝรั่งทั่วโลก และมีการระบาดอย่างรุนแรงในประเทศในแถบพื้นที่ทางตอนเหนือของยุโรป ซึ่งเป็นแหล่งผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งส่งออกมายังประเทศไทย เช่น สหราชอาณาจักร (สก็อตแลนด์) และเนเธอร์แลนด์ นอกจากนี้ประเทศอื่นๆที่ส่งหัวพันธุ์มันฝรั่งมายังประเทศไทยก็มีการรายงานพบโรคนี้ (CPC,2007) โอกาสการเข้ามาของ *S. subterranea* ขึ้นอยู่ระดับความรุนแรงของโรคในแหล่งผลิต แหล่งผลิตที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเกิดโรค มีการระบาดอย่างรุนแรง เช่น สก็อตแลนด์ จึงมีโอกาสสูงที่จะมีโรคติดมากับหัวมันฝรั่ง ส่วนแหล่งผลิตที่มีสภาพภูมิอากาศแห้งแล้ง และอุณหภูมิค่อนข้างสูงไม่เหมาะต่อการเกิดโรค เช่น อิสราเอล โอกาสที่เชื้อจะติดมาจึงอยู่ในระดับต่ำ

- การจัดการศัตรูพืช ณ แหล่งผลิต

เชื้อ *S. subterranea* อาศัยและเข้าทำลายส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน ดังนั้นการจัดการศัตรูพืชในแปลงผลิตจึงทำได้ยาก ในปัจจุบันยังไม่มีสารเคมีหรือวิธีการอื่นใดที่ใช้กำจัดเชื้อที่ติดมากับหัวมันฝรั่งหรือในดินที่ได้ผลดี การระบาดของโรคจะเกิดขึ้นอย่างรุนแรงเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมและพืชอ่อนแอต่อโรค(CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004) ขบวนการคัดแยกหลังการเก็บเกี่ยวสามารถลดจำนวนหัวมันฝรั่งที่ติดเชื้อได้แต่ก็ไม่สามารถคัดออกได้ทั้งหมด จะเห็นได้จากผลการตรวจพบที่จุดนำเข้ามีปริมาณหัวเป็นโรคติดมาจำนวนมาก

- ช่วงวงจรชีวิตของ *S. subterranea* ซึ่งมีโอกาสปะปนเข้ามากับหัวมันฝรั่ง ภาชนะบรรจุหรือพาหนะขนส่ง หัวมันฝรั่งเป็นเส้นทางหลักในการแพร่กระจายโรคในระยะไกลโดยที่เชื้อสามารถติดมากับหัวมันฝรั่งและดินในรูปของ cystosori ซึ่งเป็นสปอร์ที่พักตัว และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี (CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004)

- การรอดชีวิตของ *S. subterranea* ภายใต้สภาวะแวดล้อมขณะขนส่ง

สภาพการขนส่งหัวพันธุ์มันฝรั่งส่วนใหญ่ขนส่งมาในตู้คอนเทนเนอร์ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลซียส และมีความชื้นต่ำ ซึ่งในสภาพเช่นนี้สปอร์ของเชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ตลอดระยะเวลาขนส่ง

- ความยากง่ายในการตรวจพบที่จุดนำเข้า

หัวมันฝรั่งที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงจะแสดงอาการเป็นตุ่มนูนสีน้ำตาลขนาดประมาณ 2 มิลลิเมตร (Stevenson *et al*., 2004) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ถึงแม้ว่าลักษณะอาการของโรคจะสามารถตรวจพบได้ง่าย แต่เนื่องจากลักษณะการบรรจุหัวพันธุ์มันฝรั่งเป็นกระสอบๆละ 25 กิโลกรัมในตู้คอนเทนเนอร์ขนาดความจุ 23.5 ตัน และปริมาณนำเข้าในแต่ละครั้ง ตั้งแต่ 1-10 ตู้ขึ้นไป ทำให้การตรวจที่จุดนำเข้าไม่สามารถสุ่มตรวจได้อย่างทั่วถึง นอกจากนี้สปอร์ของเชื้ออาจติดมากับดินหรือหัวมันฝรั่งที่ปกติได้ ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงสูงที่เชื้ออาจเล็ดลอดจากการตรวจที่จุดนำเข้า

- ปริมาณและความถี่ที่นำเข้า

ประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากหลายประเทศจำนวน 40-60 ครั้ง เป็นปริมาณสูงถึง 4,000-5,000 ตันต่อปี ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงสูงที่เชื้อจะติดมากับหัวมันฝรั่งได้

2) ประเมินศักยภาพการดำรงชีพอย่างถาวร

โอกาสการดำรงชีพอย่างถาวร ต่ำ

- การมีพืชอาศัย จำนวนและชนิดของพืชอาศัย

S. subterranea มีพืชอาศัยแคบ คือ มันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกและยาสูบ และพืชอาศัยที่เชื้อสามารถอยู่ครบวงวรชีวิตได้เพียงชนิดเดียวคือ มันฝรั่ง (CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004)

- ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อม

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคคืออุณหภูมิต่ำและดินที่ระบายน้ำไม่ดี pHในดินประมาณ 4.7-7.6 (de Bore,2000) อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเข้าลายรากพืชคือ 16-17 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อยังคงสามารถทำให้เกิดโรคคือ 11 องศาเซลเซียส และ 22-25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Kole;1954) Ledingham (1935) รายงานว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายรากของมันฝรั่งได้ดีหลังจากปลูกในดินที่มี cystosori เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 18.3 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่มันฝรั่งอ่อนแอต่อโรคคือประมาณ 7 วันก่อนเริ่มสร้างหัว และ 21-28 วันหลังจากสร้างหัว (de Bore,2000) สภาพอากาศของประเทศไทยในช่วงระยะเวลาที่ปลูกมันฝรั่งในเดือนธันวาคมถึงมีนาคมมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 19-28 องศาเซลเซียส แต่โดยทั่วไปจะมีอุณหภูมิในตอนกลางวันเฉลี่ยสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำฝนน้อย

(0.1-0.9 มิลลิเมตร) (กรมอุตุนิยมวิทยา 2551) ประกอบกับพื้นที่ปลูกมันฝรั่งส่วนใหญ่จะเป็นดินร่วน น้ำไม่ขัง ดังนั้นสภาพแวดล้อมของประเทศไทยจึงไม่เหมาะสมต่อการเกิดโรค

- ความสามารถในการปรับตัวของศัตรูพืช

จากการสืบค้นข้อมูลไม่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของ *S. subterranea* แต่จากการสังเกตว่าประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีเชื้อ *S. subterranea* ติดเข้ามาเป็นเวลานาน แต่จาการสำรวจโรคของมันฝรั่งยังไม่มีรายงานพบโรคนี้ จึงสันนิษฐานได้ว่าเชื้อ *S. subterranea* ไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของ ประเทศไทยได้ หรือมีศักยภาพในการปรับตัวต่ำ

- วิธีการมีชีวิตอยู่รอดของศัตรูพืช

S. subterranea สามารถอยู่รอดในรูป cystosori ซึ่งเป็นสปอร์อยู่ในระยะพักสามารถอยู่ในดินได้นานกว่า 6 ปี และสามารถมีชีวิตรอดผ่านท่อทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง สปอร์จะงอกต่อเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและได้รับการกระตุ้นจากรากของพืชอาศัย (CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004)

3) ประเมินโอกาสการแพร่ระบาดของ *S. subterranea* ในประเทศไทย

โอกาสแพร่ระบาด ปานกลาง

- การกระจายตัวของพืชอาศัย

S. subterranea มีพืชอาศัยที่สามารถอยู่ครบวงวรชีวิตได้เพียงชนิดเดียวคือ มันฝรั่ง และ มันฝรั่งที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์ Atlantic และ Spunta ซึ่งค่อนข้างอ่อนแอต่อโรค powdery scab (Falloon,1993) พื้นที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย จำกัดอยู่เฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออก เฉียงเหนือ คือในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง ตาก สกลนครและหนองคาย

- ความสามารถในการขยายพันธุ์

ภายในแผลสะเก็ดบนหัวมันฝรั่งที่ติดเชื้อจะเต็มไปด้วย cystosori ซึ่งประกอบไปด้วย 500-1000 cyst เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมและมีพืชอาศัย cyst จะสร้าง primary zoospore ซึ่งจะเข้าทำลายรากพืชและสร้าง secondary zoospore ซึ่ง สามารถเข้าทำลายรากพืชและหัวมันฝรั่งและสร้าง secondary zoospore ต่อไป (Ledingham,1935 ; Kole,1954)

- วิธีการแพร่กระจาย

สปอร์ของเชื้อสามารถเคลื่อนย้ายในระยะไกลโดยติดไปกลับหัวมันฝรั่ง ดินหรือเครื่องมือทางการเกษตร การเคลื่อนย้ายดินหรือหัวมันฝรั่งจากแหล่งที่เป็นโรคสามารถแพร่กระจายเชื้อได้ดี หากเกษตรกรนำหัวพันธุ์จากแหล่งเป็นโรคไปใช้ทำพันธุ์ต่อในฤดูต่อไป

นอกจากนี้เชื้ออาจแพร่กระจายไปกับน้ำฝนหรือน้ำชลประทานที่ใช้เพาะปลูกได้ (CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004)

- ศัตรูธรรมชาติ

จากข้อมูลทางชีววิทยาไม่มีศัตรูธรรมชาติของเชื้อ *S. subterranea*

- สิ่งกีดขวางโดยธรรมชาติ

ลักษณะภูมิประเทศของประเทศไทยไม่มีสิ่งกีดขวางทางธรรมชาติเช่น ภูเขา ทะเล หรือทะเลทราย ที่สามารถสกัดกั้นการแพร่กระจายของเชื้อได้

4.2.3 การประเมินผลกระทบทางเศรษฐกิจ

ผลกระทบทางเศรษฐกิจ ปานกลาง

ความสูญเสียด้านเศรษฐกิจไม่มีความสำคัญในมันฝรั่งบริโภคสด เมื่อหัวมันฝรั่งที่จำหน่ายในตลาดไม่ได้มีการล้างหัว เนื่องจากโรคปรากฏอยู่เพียงบริเวณผิวของหัวมันฝรั่ง ซึ่งสามารถปอกเปลือกออกได้ แต่ในปัจจุบันมีความนิยมล้างหัวมันฝรั่งสำหรับจำหน่ายเพื่อบริโภคสด หัวมันฝรั่งที่มีอาการ scab ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง เช่น สก็อตแลนด์ มีรายงานความสูญเสียถึง 6-8 ล้านปอนด์ในปี 1998 นอกจากนี้ประเทศที่ผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการส่งออก ประสบปัญหาเนื่องจากประเทศผู้ซื้อไม่ต้องการหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีโรค powdery scab ในบางพื้นที่เกษตรกรจำเป็นต้องยกเลิกการผลิตมันฝรั่งเพื่อใช้ทำพันธุ์ เนื่องจากมีสปอร์ของเชื้อปนเปื้อนในดิน (Wale,2000)

สำหรับประเทศไทยหากเชื้อ *S. subterranea* เข้ามาระบาดทำความเสียหาย แม้ว่าผลกระทบจะเกิดขึ้นเฉพาะกับมันฝรั่ง แต่จากคุณสมบัติของสปอร์ของเชื้อที่สามารถคงทนอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน และยากต่อการกำจัดให้หมดไป อาจทำให้พื้นที่ที่มีเชื้ออยู่ในดินไม่สามารถปลูกมันฝรั่งได้ นอกจากนี้ *S. subterranea* ยังเป็นพาหะของ *Potato mop top virus* ซึ่งเป็นโรคที่ทำให้ต้นมันฝรั่งแคระแกรน ชะงักการเจริญเติบโต และภายในหัวมันฝรั่งเกิดอาการแผลสีน้ำตาล (spraing) และยังเป็นเส้นทางให้เชื้อโรคชนิดอื่นๆ แอบแฝงติดไปกับหัวพันธุ์มันฝรั่งด้วย เช่นเชื้อรา *Phytophthora infestans, P. erythroseptica, Fusarium* spp. และ *Colletotrichum coccodes* เป็นต้น (CPC,2007; Stevenson *et al*., 2004)

4. 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช

มาตรการจัดการความเสี่ยง *S. subterranea* ที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ

1. มาตรการทั่วไป

1.1 การประเมินวิธีการผลิตและตรวจรับรอง

กำหนดให้มีระบบการตรวจประเมินเพื่อการยอมรับ (accreditation system) เกี่ยวกับกระบวนการผลิตหัวพันธุ์และกระบวนการออกใบรับรองสุขอนามัยพืช

1.1.1 การตรวจประเมินกระบวนการผลิตหัวพันธุ์ (Seed Certification Scheme) ณ ประเทศต้นทาง เพื่อให้เชื่อมั่นว่ามีกระบวนการผลิตที่ได้มาตรฐาน มีการตรวจสอบและจัดการศัตรูพืชในแปลงผลิต ตรงตามเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพหัวพันธุ์ และปราศจากศัตรูพืชกักกัน

1.1.2 การตรวจประเมินกระบวนการออกใบรับรองสุขอนามัยพืชก่อนการส่งออก

1) ตรวจสอบความพร้อมห้องปฏิบัติการตรวจวินิจฉัยโรคพืช ทั้งด้านเครื่องมืออุปกรณ์และบุคลากร

2) ตรวจสอบมาตรฐานการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์ เพื่อการตรวจสอบศัตรูพืช

3) ตรวจสอบเกณฑ์การคัดหัวพันธุ์ให้มีเชื้อ *S. subterranea* และดินไม่เกินเงื่อนไขที่กำหนด

4) ตรวจสอบการจัดการศัตรูพืชกับหัวพันธุ์ก่อนการออกใบรับรองสุขอนามัยพืช

1.2 การผลิตและการรับรอง

1.2.1 หัวพันธุ์มันฝรั่งต้องผ่านการตรวจรับรองตามข้อกำหนดที่ระบุไว้ในมาตรฐานการผลิตและรับรองหัวพันธุ์มันฝรั่ง (Seed Potatoes Certification Standard)

1.2.2 หัวพันธุ์มันฝรั่งต้องผ่านการตรวจรับรองว่าปราศจากศัตรูพืชกักกัน

1.3 ข้อกำหนดสำหรับดิน

- ดินที่มีลักษณะเป็นผงติดมากับหัวมันฝรั่ง ต้องมีน้ำหนักไม่เกิน 100 กรัมต่อหัวมันฝรั่งน้ำหนัก 100 กรัม สำหรับดินที่มีลักษณะเป็นก้อนติดบนหัวมันฝรั่งครอบคลุมพื้นที่ผิวเกินกว่า 20% มีได้ไม่เกิน 5% จากหัวมันฝรั่งจำนวน 600 หัว

แม้ว่าดินเป็นสิ่งต้องห้ามตามเป็นสิ่งต้องห้าม ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะ เป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้นและเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. ลงวันที่ 26 เมษายน 2550 แต่เนื่องจากหัวมันฝรั่งเป็นส่วนที่อยู่ใต้ดิน ในทางปฏิบัติจึงไม่สามารถกำหนดเงื่อนไขให้ปราศจากดินได้ ดังนั้นเพื่อความชัดเจนในการปฏิบัติจึงต้องกำหนดมาตรฐานสำหรับระดับที่ยอมรับได้ของดินที่ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง

ตามมาตรฐานแห่งชาติสำหรับการรับรองหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศออสเตรเลีย (National Standard for Certification of Seed Potatoes) กำหนดมาตรฐานสำหรับดินไว้ว่าหัวพันธุ์มันฝรั่งต้องปราศจากดินเท่าที่จะสามารถปฏิบัติได้ (practically free of soil) (APIC,2001) ส่วนมาตรฐานของกลุ่มประเทศยุโรป United Nations Economic Commission for Europe : UNECE กำหนดว่าดินและสิ่งเจือปนอื่น (earth and extraneous matter) ต้องมีไม่เกิน 2% โดย

น้ำหนัก(UNECE,2005) มาตรฐานการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งของประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Standards for Grades of Seed Potatoes) มีข้อกำหนดเกี่ยวกับดินโดยแยกเป็น ดินที่มีลักษณะเป็นผง (loose soil) มีได้ไม่เกิน 0.5 % โดยน้ำหนัก สำหรับดินที่มีลักษณะเป็นก้อนติดบนหัวมันฝรั่ง (caked soil) ครอบคลุมพื้นที่ผิวเกินกว่า 25% มีได้ไม่เกิน 10% จากจำนวนหัวมันฝรั่ง (USDA,1997)

1.4 ข้อกำหนดสำหรับเชื้อ *S. subteranea*

1.4.1 หัวพันธุ์มันฝรั่งจะต้องผ่านการตรวจลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อ *S. subteranea* โดยหน่วยงานที่รับผิดชอบ โดยกำหนดให้ระดับที่ยอมรับได้สำหรับอาการที่เกิดจากเชื้อ *S. subteranea* คือ

หัวพันธุ์มันฝรั่งจากสก็อตแลนด์ :

หัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวนไม่เกิน 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของหัวพันธุ์มันฝรั่งซึ่งแสดงอาการของโรคครอบคลุมพื้นที่ผิว 5 เปอร์เซ็นต์ของหัวมันฝรั่ง

หัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศอื่น ๆ :

หัวมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคที่สามารถตรวจพบได้ (5 แผลหรือมากกว่าต่อหัว) ต้องมีไม่เกิน 2%

1.4.2 เมื่อหัวพันธุ์มันฝรั่งมาถึงประเทศไทย เจ้าหน้าที่กักกันพืชจะต้องสุ่มตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 600 หัว เพื่อตรวจโรค powdery scab ว่าไม่เกินระดับที่กำหนด

1.4.3 หลังจากอนุญาตให้นำหัวพันธุ์มันฝรั่งไปปลูก เจ้าหน้าที่กักกันพืชจะต้องติดตามตรวจสอบ ในแปลง เพื่อเฝ้าระวัง การระบาดของโรค powdery scab

แม้ว่า เชื้อ *Spongospora subterranea* เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย แต่พบระบาดทั่วไปในแหล่งปลูกมันฝรั่งทั่วโลก ทำให้ไม่สามารถจะนำเข้าจากแหล่งที่ปราศจากเชื้อได้ ประกอบกับผลการวิเคราะห์ความเสี่ยง เชื้อ *Spongospora subterranea* พบว่ามีโอกาสการเจริญและตั้งรกรากในประเทศไทยต่ำ แต่ก็นับว่ายังมีความเสี่ยงอยู่ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องกำหนดมาตรการควบคุมโดยกำหนดระดับที่ยอมรับได้ของโรค powdery scab บนหัวพันธุ์มันฝรั่งให้อยู่ในระดับต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับมาตรฐานของกลุ่มประเทศยุโรป United Nations Economic Commission for Europe: UNEC ซึ่งกำหนดเกี่ยวกับโรค powdery scabไว้คือต้องมีหัวพันธุ์มันฝรั่งไม่เกิน 3% โดยน้ำหนักของหัวพันธุ์มันฝรั่งซึ่งแสดงอาการโรคครอบคลุมพื้นที่ผิวเกินกว่า 10% ของหัวมันฝรั่ง (UNECE,2005)

สรุปผลการทดลอง

จากการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าในปี 2548-2550 ตรวจพบเชื้อ *S. subterranea* ติดมากับหัวพันธุ์มันฝรั่งจากสก็อตแลนด์ และออสเตรเลีย เมื่อทดสอบการเกิดโรคโดยนำหัวพันธุ์

มันฝรั่งที่เป็นโรคไปปลูกทดสอบ และติดตามตรวจสอบการเกิดโรคในแปลงเกษตรกรที่ใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งที่เป็นโรค ผลการตรวจไม่พบโรคทั้งในสถานที่ทำการทดลอง และในแปลงเกษตรกร

การประเมินศักยภาพในการเข้ามา การดำรงชีพอย่างถาวรและการแพร่ระบาด รวมทั้งผลกระทบทั้งทางเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อมพบว่า เชื้อ *S. subterranea* มีศักยภาพปานกลางถึงสูงในการติดเข้ามากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง ศักยภาพในการตั้งรกรากอย่างถาวรอยู่ในระดับต่ำและแพร่ระบาดของเชื้อในประเทศไทยอยู่ในระดับปานกลาง แต่อย่างไรก็ดี เมื่อพิจารณาถึงผลกระทบทางเศรษฐกิจ และสิ่งแวดล้อม หากเชื้อ *S. subterranea* เข้ามาระบาดทำความเสียหายในพื้นที่ผลิตมันฝรั่งของประเทศไทย ผลกระทบโดยตรง นอกจากจะทำให้ผลผลิตมันฝรั่งลดลง ยังทำให้คุณภาพไม่เหมาะสมต่อการบริโภค และไม่เป็นที่ต้องการของโรงงานอุตสาหกรรม ส่วนผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมคือ สปอร์ของเชื้อสามารถคงทนอยู่ในดินได้เป็นเวลานาน ทำให้พื้นที่ที่มีการระบาดไม่สามารถปลูกมันฝรั่งได้ และการกำจัดเชื้อในดินต้องใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงอาจทำให้เกิดพิษตกค้างในดินหรือสิ่งแวดล้อมได้

จากผลการประเมินความเสี่ยงของเชื้อ *S. subterranea* แสดงให้เห็นถึงความจำเป็นที่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ โดยกำหนดให้ประเทศที่ต้องการส่งหัวพันธุ์มันฝรั่งมายังประเทศไทยจะต้องมีการจัดการโรค powdery scab ตั้งแต่ในแปลงปลูก และในขบวนการเก็บเกี่ยวต้องมีการคัดแยกหัวที่เป็นโรค และ จะต้องมีการตรวจรับรองโรค powdery scab โดยหน่วยงานที่มีหน้าที่รับผิดชอบ ตามเงื่อนไขของประเทศไทยก่อนที่จะมีการส่งออก

เอกสารอ้างอิง

กรมศุลกากร.2550. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. http://www.customs.go.th/StatisticResult.jsp.

กรมอุตุนิยมวิทยา.2551.รายงานข้อมูลอุตุนิยมวิทยา. http://www.tmd.go.th/province.php?id=2

APIC. 2001. National Standard for Certification of Seed Potatoes. The Expert Foundation, Melbourne.

Braithwaite, M., Falloon, R.E., Genet, R.A., Wallace, A.R., Fletcher, J.D., Braam, W.F.1994. Control of powdery scab of potatoes with chemical seed tuber treatments. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 22:121-128.

Crop Protection Compendium 2007. Crop Protectection Compendium Global Module 2nd Edition. CAB Internation

De Boer, R. 2000. Research into the biological and control of powdery scab of potato in Australia. pp. 79 – 83. In Proceeding of the First European Powdery Scab Workshop. 20 - 22 July 2000 Aberdeen, Scotland.

Falloon R. 1993. Powdery scab of potatoes. Available source: http://www.crop.cri.nz/broadshe/powder.htm

FAO. 2004. International Standards for Phytosanitary Measures. ISPM No 11. Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risk and modified organisms. FAO, Rome.

FAO. 2005. International Standards for Phytosanitary Measures. ISPM No 2. Guidelines for pest risk analysis. FAO, Rome.

FAO. 2006. International Standards for Phytosanitary Measures. ISPM No 5. Glossary of Phytosanitary terms. FAO, Rome.

Hims M., 1976 .The biology of *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. f.sp. *subterranea* Tomlinson, the cause of powdery scab disease of potato . Leeds, UK:University of Leeds, PhD thesis. PhD thesis.

Kole A.P., 1954. Contribution to the knowledge of *Spongospora subterranea* the couse of potatoes. Tijdschrift over Plantenziekten 60;1-65.

Ledingham GA., 1935. Occurrence of zoosporangia in *Spongospora subterranean* (Wallroth) Lagerheim. Nature 135:394

Spongospora PIN BOARD.2000 . Available source: http://www.pa.ipw.agrl.ethz.ch/spongospora/pinboard.htm

Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D. and Weingartner, D.P. 2004. Compendium of Potato Diseases. The American Phytopathologal Society. Minnesota.106 p.

Merz, U. 2000. Experiments on direct control and yield loss made in New Zealand *In* U. Merz and A.K. Lee, eds. Proceedings of the First European Powdery scab Workshop. Scottish Agricultural College, Aberdeen.

UNECE. 2005. Standard for Seed Potatoes. United Nations, New york.

USDA. 1997. United States Standards for Grades of Seed Potatoes. Available source: http://www.ams.usda.gov/standards/potatoes.pdf

Wale, S. 2000. Summary of the session on national potato production and the powdery scab situation. pp 3-9. *In* U. Merz and A.K. Lee, eds. Proceedings of First European Powdery scab Workshop. Scottish Agricultural College, Aberdeen.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลการตรวจ powdery scab ในหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ

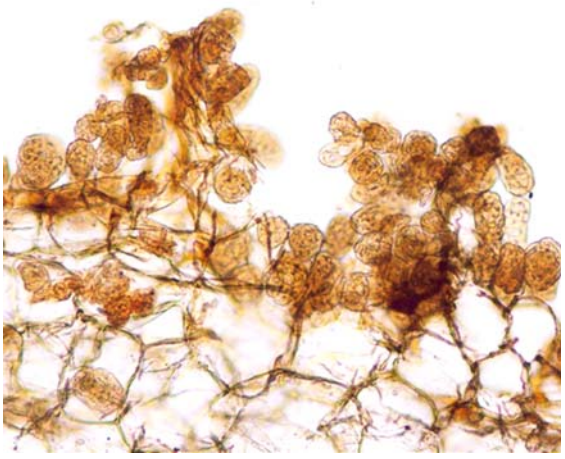
ประเทศ	ปี	ปริมาณนำเข้า รายการ/น้ำหนัก (ตัน)	ผลการตรวจพบ powdery scab	
			เกินเงื่อนไขที่กำหนด* รายการ/น้ำหนัก (ตัน)	ไม่เกินเงื่อนไขที่กำหนด รายการ/น้ำหนัก (ตัน)
สก๊อตแลนด์	48	30/3,372	1/7.5	11/1,543
	49	30/2,282	-	14/12,95
	50	18/1,974	1/141	10/893
ออสเตรเลีย	48	13/1,174	1/70.5	3/94
	49	14/1,574	-	3/141
	50	14/1,001	-	3/117.5
เนเธอร์แลนด์	48	3/150	ไม่พบ	ไม่พบ
	49	3/162		
	50	3/211		
อิสราเอล	48	1/50	ไม่พบ	ไม่พบ
	49	-		
	50	-		
นิวซีแลนด์	48	-	ไม่พบ	ไม่พบ
	49	1/24		
	50	2/69		
แคนาดา	48	-	ไม่พบ	ไม่พบ
	49	2/258		
	50	-		

*เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากประเทศออสเตรเลียกำหนดระดับที่ยอมรับได้สำหรับโรค powdery scab ว่าต้องมีหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวนไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแสดงอาการของโรคที่สามารถตรวจพบได้(ระดับของโรค powdery scab ซึ่งแสดงอาการที่สามารถตรวจพบได้คือจำนวน 5 รอยแผลหรือมากกว่าต่อหัว)

เงื่อนไขการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งสก็อตแลนด์กำหนดระดับที่ยอมรับได้สำหรับโรค powdery scab ว่าต้องมีหัวพันธุ์มันฝรั่งจำนวนไม่เกิน 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของหัวพันธุ์มันฝรั่งซึ่งแสดงอาการของโรคครอบคลุมพื้นที่ผิว 5 เปอร์เซ็นต์ของหัวมันฝรั่ง

ภาพที่ 1 การตรวจศัตรูพืชในหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศ
ก การสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่ง ณ ด่านนำเข้า
ข การตรวจศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการโรค powdery scab บนหัวมันฝรั่ง



ภาพที่ 3 cystosori ของเชื้อ *S. subterranea*

ภาพที่ 4 การทดสอบศักยภาพการเกิดโรค Powdery scab

ภาพที่ 5 การติดตามตรวจสอบโรคในแปลงผลิตมันฝรั่งของเกษตรกร

ภาพที่ 6 ลักษณะอาการของโรค common Scab สาเหตุจาก *Streptomyces* sp.

ภาพที่ 7 ลักษณะของเชื้อ *Streptomyces* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศชิลี

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Table Grape from Chile

ชลธิชา รักใคร่ อุดร อุณหวุฒิ สุรพล ยินอัศวพรรณ นงพร มาอยู่ดี
ณัฏฐพร อุทัยมงคล อดุลย์รัตน์ แคล้วคลาด อลงกต โพธิ์ดี
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ประเทศชิลีเป็นแหล่งผลิตองุ่นใหญ่เป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากอิตาลีซึ่งมีผลผลิตในปีดังกล่าวปริมาณ 860,000 ตัน องุ่นที่ผลิตในชิลีมีทั้งหมด 35 สายพันธุ์ผลผลิต ทั้งหมดเป็นองุ่นไร้เมล็ดคิดเป็น 36.7% ขององุ่นไร้เมล็ดทั่วโลกผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากเอกสารวิชาการและจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ พบว่ามีศัตรูพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 371 ชนิด เป็นแมลง 176 ชนิด ไร 10 ชนิด ไวรัส 33 ชนิด ไวรอยด์ 6 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด เชื้อรา 60 ชนิด ไส้เดือนฝอย 14 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด และวัชพืช 66 ชนิด ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชแล้วมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปรับมาตรการในการควบคุมการนำเข้าใหม่ กรณีที่เป็นแมลงศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูงกำหนดให้รมยาด้วย Methyl bromideที่ประเทศต้นทางก่อนการส่งออก หรือจะรมเมื่อสินค้ามาถึงประเทศปลายทางก่อนการนำเข้าก็ได้ กรณีเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดนั้น เช่นโรค Pierce's disease ที่เกิดจากเชื้อ *Xylella fastidiosa* ผลการประเมินความเสียงจะออกมาในระดับต่ำเพราะไม่ติดมากับผลสด ที่นำเข้า และพบว่าโรคนี้อยู่ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นองุ่นที่จะส่งออกมาประเทศไทยต้องเก็บรักษาที่โรงงานบรรจุเอาไว้ก่อนการส่งออก 1-2 วัน ที่อุณหภูมิ 1-3C และสำหรับวัชพืชทีมีรายงานการแพร่ระบาดในแปลงผลิตให้มีการจัดการในแปลงผลิตและให้มีการตรวจสอบก่อนการส่งออกทั้งนี้ในการนำเข้าผลสดต้องไม่มีกิ่งก้านและใบติดเข้ามาด้วย เมื่อสินค้าทั้งหมดมาถึงประเทศไทยจะตรวจสอบเอกสารนำเข้าก่อนและจะสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชหากไม่พบจึงจะอนุญาตให้นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยได้

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-02-01-51

คำนำ

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 องุ่นผลสดที่นำเข้าจากต่างประเทศทุกประเทศรวมทั้งจากชิลีจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials)เพียงแต่แจ้งการนำเข้าโดยไม่ต้องมีการขออนุญาตก่อนนำเข้า หรือมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชกำกับมา และไม่ต้องมีคำรับรองพิเศษเพิ่มเติมแต่อย่างใด จึงมีความเสี่ยงที่จะมีเชื้อโรคแมลงศัตรูพืชติดเข้ามาจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (pest risk analysis) ของพืชนำเข้า ด้วยวิธีการตามความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช(Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Agreement:SPS) และใช้วิธีการขั้นตอนตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม" (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk)โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อให้ทราบว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกันและ นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้าต่อไป หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. องุ่นผลสดที่นำเข้าจากประเทศชิลี
2. กล้องจุลทรรศน์ (Stereo microscope)
3. แผ่นบันทึกข้อมูลศัตรูพืช
4. วัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช/ศัตรูพืช
5. หนังสือ และ วารสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ
6. เอกสารจากมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม" (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk)
7. วัสดุและอุปกรณ์คอมพิวเตอร์สำหรับการสืบค้นข้อมูล
8. วัสดุอุปกรณ์รวมทั้งสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
9. ดินผสม ปุ๋ย สารเคมีกำจัดศัตรูพืช
10. โรงปลูกพืช

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืช
2. รวบรวมข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับข้อมูลในประเทศ
3. เก็บตัวอย่างและตรวจสอบศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า ณ จุดที่มีการนำเข้า
4. สำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแหล่งปลูก
5. วิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน
6. กำหนดมาตรการทางวิชาการ/ กฎหมาย เพื่อควบคุมการนำเข้า
7. สรุปผลและเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552 (2 ปี)

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และ ด่านตรวจพืช

ผลและวิจารณ์การทดลอง

องุ่น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Vitidaceae เป็นพืชล้มลุก มีลักษณะเป็นไม้เลื้อย เนื้อแข็ง มีกิ่งก้านเล็ก ต้องเลื้อยเกาะกิ่งไม้ ใบกลม ขอบหยักเว้าลึก 3 -7 พู โคนใบเว้าหัวใจ ดอกออกเป็นช่อแยกแขนง ดอกย่อยขนาดเล็กสีเขียว โคนเชื่อมติดกัน ปลายแยก 5 กลีบ ผลออกเป็นพวง ผลย่อยรูปกลมรี ฉ่ำน้ำ ผิวมีนวลเกาะ รสหวาน มีสีเขียว ม่วงแดง และม่วงดำ แล้วแต่พันธุ์ มี 1-4 เมล็ด สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตหนาว เขตกึ่งร้อนกึ่งหนาว และเขตร้อน พันธุ์ที่นิยมปลูก พันธุ์ไวท์มะละกา มี 2 สายพันธุ์ คือ ชนิดผลกลมและผลยาว ลักษณะช่อใหญ่ยาว การติดผลดีผลมีสีเหลืองอมเขียว รสหวานแหลม เปลือกหนาและเหนียว ในผลหนึ่งๆ มี 1-2 เมล็ด ช่วงเวลาหลังจากตัดแต่งกิ่งจนเก็บผลได้ประมาณ 4 เดือนครึ่ง ปีหนึ่งให้ผลผลิต 2 ครั้ง ผลผลิตประมาณ 10-15 กิโลกรัม/ต้น/ครั้ง พันธุ์คาร์ดินัล มีลักษณะช่อใหญ่ ผลดก ผลกลมค่อนข้างใหญ่ มีสีแดงหรือม่วงดำ รสหวาน กรอบ เปลือกบาง จึงทำให้ผลแตกง่ายเมื่อผลแก่ในช่วงฝนตกชุก ในผลหนึ่งๆ มีเมล็ด 1-2เมล็ด ช่วงเวลาหลังจากตัดแต่งกิ่งจนเก็บผลได้ใช้เวลา 3-3 เดือนครึ่ง ในเวลา 2 ปี สามารถให้ผลผลิตได้ถึง 5 ครั้ง ผลผลิตประมาณ 10-15 กิโลกรัม/ต้น/ครั้ง เขตปลูกองุ่นของโลกนั้นกว้างมาก สามารถปลูกได้ในพื้นที่สูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับความสูง 6,000 ฟุต แต่แหล่งปลูกองุ่นที่มีคุณภาพดี มักอยู่ในระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 1,000 - 4,000 ฟุต ตามราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดย พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 องุ่นจากทุกแหล่งทั่วโลกเดิมจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม ขั้นตอนการนำเข้าซึ่งสิ่งไม่ต้องห้าม จึงเพียงแต่ให้แจ้งการนำเข้าต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ ด่านตรวจพืชที่นำเข้าเท่านั้น ผลการศึกษา

เบื้องต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้จัดให้องุ่นเป็นสิ่งต้องห้าม ในขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pests categorization) นั้น พบว่า มีสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นศัตรู/ไม่เป็นศัตรูขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 371 ชนิด เป็นแมลง 176 ชนิด ไร 10 ชนิด ไวรัส 33 ชนิด ไวรอยด์ 6 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด เชื้อรา 60 ชนิด ไส้เดือนฝอย 14 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด และวัชพืช 66 ชนิด จำเป็นอย่างยิ่งต้องปรับเปลี่ยนมาตรการสุขอนามัยที่ใช้ควบคุมการนำเข้าองุ่นจากต่างประเทศเนื่องจากมีศัตรูพืชกักกันหลายชนิดที่เป็นศัตรูพืชร้ายแรงซึ่งมีโอกาสติดกับองุ่นเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทยได้ การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน (Risk management) ควรจะประกอบด้วยมาตรการ ดังนี้ กรณี แมลง มาตรการในการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่อาจติดมากับองุ่นนำเข้าจากชิลีนั้นในกรณีที่เป็นแมลงสัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงต่ำ 9 ชนิด มีความเสี่ยงปานกลาง 4 ชนิดและมีความเสี่ยงสูง 3 ชนิดกรณีที่มีความเสี่ยงต่ำกำหนดให้ตรวจสอบก่อนการส่งออกที่ประเทศต้นทาง (Visual Inspection)ศัตรูพืชที่มีความเสี่ยงในระดับปานกลางและสูงนั้นกำหนดให้รมยาด้วย Methyl bromideโดยประเทศผู้นำเข้าจะกำหนดอัตรา และระยะเวลาในการรมยา และ/หรือให้เลือกว่าจะทำการรมยาที่ประเทศต้นทางหรือจะรมเมื่อสินค้ามาถึงประเทศปลายทางก่อนการนำเข้า ในการรมยานั้นเพื่อป้องกันมิให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทยเพื่อกำจัดแมลงได้โดยตรงซึ่งดีกว่าการตรวจสอบโดยตรงด้วยสายตา (Visual Inspection) กรณีเชื้อสาเหตุ โรคพืช ขององุ่นที่สำคัญเช่นโรค Zonate leaf spot ที่เกิดจากเชื้อ *Cristulariella moricola* นี้เกิดการแพร่กระจายรุนแรงในสหรัฐอเมริกาปี 1993และ 1996 แต่ปัจจุบันในแคลิฟอร์เนียไม่พบแล้ว และได้ทำการสำรวจเพื่อเฝ้าระวัง (Surveillance)หากเมื่อใดมีการตรวจพบเชื้อนี้จะต้องแจ้งให้กรมวิชาการเกษตรทราบทันที โรค Pierce's disease ทีเกิดจากเชื้อ *Xylella fastidiosa*, โรค Black measl esca ที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Stereum hirsutum*, โรค authum leaf spot ที่เกิดจากเชื้อ *Metschnikowia pulcherrima* โรคเหล่านี้แม้ว่าผลการประเมินความเสียงจะออกมาในระดับต่ำเพราะไม่ติดมากับผลแม้ว่าจะเป็นโรคร้ายแรงก็ตามเช่นโรค Pierce's disease ทีเกิดจากเชื้อ *Xylella fastidiosa* เนื่องจากผลการวิจัยพบว่าโรคนี้อยู่ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นองุ่นที่จะส่งออกมาประเทศไทยต้องเก็บรักษาที่โรงงานบรรจุเอาไว้ก่อนการส่งออกที่อุณหภูมิ1-3 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามองุ่นที่นำเข้าห้ามมีใบองุ่น กิ่งหรือก้านติดมากับผลองุ่นเด็ดขาดหากตรวจพบจะโดนเผาทำลาย และกรณีวัชพืช การบรรจุหีบห่อองุ่นจากสวนต้องระมัดระวังมิให้เมล็ดวัชพืชที่สำคัญทางกักกันพืชของประเทศไทยติดปะปนมากับองุ่นและทุกครั้งที่มีการนำเข้าจะทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อการตรวจสอบ (Inspection) วัชพืชกักกันหากพบว่ามีการติดปะปนมากับองุ่นนำเข้าและไม่มีวิธีกำจัดที่มีประสิทธิภาพสินค้าชุดนั้นๆจะถูกยึดเผาทำลาย ถ้าประเทศผู้ส่งออกสามารถจัดการความเสี่ยงได้ครบสามารถส่งองุ่นผลสดเข้ามาจำหน่ายที่ประเทศไทยได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ประเทศชิลีเป็นแหล่งผลิตองุ่นใหญ่เป็นอันดับ 2 ของโลกรองจากอิตาลีซึ่งมีผลผลิตในปีดังกล่าวปริมาณ 860,000 ตัน องุ่นที่ผลิตในชิลีมีทั้งหมด 35 สายพันธุ์ผลผลิต ทั้งหมดเป็นองุ่นไร้เมล็ดคิดเป็น 36.7% ขององุ่นไร้เมล็ดทั่วโลกผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากเอกสารวิชาการและจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของ พบว่ามีศัตรูพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 371 ชนิด เป็นแมลง 176 ชนิด ไร 10 ชนิด ไวรัส 33 ชนิด ไวรอยด์ 6 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด เชื้อรา 60 ชนิด ไส้เดือนฝอย 14 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด และวัชพืช 66 ชนิด ดำเนินการสุ่มตัวอย่าง องุ่นนำเข้าจากชิลีได้ตัวอย่าง 12 ตัวอย่าง ยังไม่พบศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชแล้วมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปรับมาตรการในการควบคุมการนำเข้าใหม่ ในเบื้องต้นกรณีที่เป็นแมลงศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูงนั้นกำหนดให้รมยาด้วย Methyl bromideโดยให้เลือกว่าจะทำการรมยาที่ประเทศต้นทางก่อนการส่งออก หรือจะรมเมื่อสินค้ามาถึงประเทศปลายทางก่อนการนำเข้า เพื่อกำจัดแมลงป้องกันมิให้ศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทยได้ กรณีเชื้อสาเหตุ โรคพืช เช่นโรค Zonate leaf spot ที่เกิดจากเชื้อ *Cristulariella moricola* นี้มีการแพร่กระจายรุนแรงในสหรัฐอเมริกาปี 1993และ 1996 แต่ปัจจุบันไม่พบแล้ว และได้ทำการสำรวจเพื่อเฝ้าระวัง (Surveillance) อยู่ประจำนั้น หากเมื่อใดมีการตรวจพบเชื้อนี้จะต้องแจ้งให้กรมวิชาการเกษตรทราบทันที สำหรับโรค Pierce's disease ที่เกิดจากเชื้อ *Xylella fastidiosa* , โรค Black measl esca จากเชื้อสาเหตุ *Stereum hirsutum* ,โรค authum leaf spot ที่เกิดจากเชื้อ *Metschnikowia pulcherrima* โรคเหล่านี้แม้ว่าผลการประเมินความเสียงจะออกมาในระดับต่ำเพราะไม่ติดมากับผลสด ที่นำเข้า และพบว่าโรคนี้อยู่ได้ไม่เกิน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นองุ่นที่จะส่งออกมาประเทศไทยต้องเก็บรักษาที่โรงงานบรรจุเอาไว้ก่อนการส่งออก 1-2 วัน ที่อุณหภูมิ 1-3 องศาเซลเซียส และสำหรับวัชพืชที่มีรายงานการแพร่ระบาดในแปลงผลิตให้มีการจัดการในแปลงผลิตและตรวจสอบก่อนการส่งออกทั้งนี้ในการนำเข้าผลสดต้องไม่มีกิ่งก้านและใบติดเข้ามาด้วย เมื่อสินค้าทั้งหมดมาถึงประเทศไทยจะตรวจสอบเอกสารนำเข้าก่อนและจะสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชหากไม่พบจึงจะอนุญาตให้นำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทยได้

เอกสารอ้างอิง

1. กรมศุลกากร.2549. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. http://www.customs.go.th.

2. จุมพล สาระนาค อรพรรณ วิเศษสังข์ และจักรพงษ์ เจิมศิริ. 2540. โรคผัก. คู่มือนักวิชาการภาคสนาม ฝ่ายวิเคราะห์และบริการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร.113 หน้า.

3. พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สหมิตรพริ้นติ้ง อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี. 285 หน้า.

4. สมบูรณ์ เจริญฤทธิ์. 2543. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การประชุมสัมมนาเรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest risk analysis) เพื่อการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร 26 กันยายน 2546 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. 5 หน้า

5. 8.ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ Terebrantia. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

6 .ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เพลี้ยไฟ Terebrantia. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

7. สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช : โรคและการจัดการ. วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ. 204 หน้า.

8. Allad-Iw, A.L. That culprit called GATT-WTO. Nordis weekly.April 24, 2005. www.nordis.net.

9. Anonymous 1996. Guidelines for pest risk analysis. ISPM Pub. No. 2, FAO, Rome.

10. Anonymous 2003. Pest risk analysis for quarantine pests including analysis ofenvironmental risks. ISPM Pub. No. 11 Rev. 1, FAO, Rome.

11. CABI. 2007. Crop Protection Compendium [CD-ROM]. CAB International. Wallingford, UK.

12. USDA, 2006. Treatment schedule 88 pp. *In* USDA Treatment manual. USDA-APHIS

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Grape from Australia

อลงกต โพธิ์ดี อดุลย์รัตน์ แคล้วคลาด วรัญญา มาลี วาสนา ฤทธิ์ไธสง
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2551 -กันยายน 2552 ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อทราบชนิดศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับผลสดองุ่นนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชข้อมูลศัตรูพืชขององุ่นจากการศึกษารวบรวมรายงานจากทั่วโลกมีศัตรูพืชขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 373 ชนิด ซึ่งเป็นศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศออสเตรเลียจำนวน 120 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 45 ชนิด ไร 9 ชนิด ไส้เดือนฝอย 17 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด เชื้อรา 20 ชนิด แบคทีเรีย 7 ชนิด ไวรัส 14 ชนิด และวัชพืช 7 ชนิด สำหรับศัตรูองุ่นที่มีรายงานในประเทศไทยพบจำนวน 58 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 28 ชนิด ไร 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด และวัชพืช 2 ชนิด ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World Trade organization, WTO) ทำให้ประเทศสมาชิกต้องปฏิบัติตามข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตมนุษย์ สัตว์และพืช จากสิ่งปนเปื้อน สารพิษ หรือเชื้อโรคที่มีพืชหรือสัตว์เป็นตัวนำ เพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายอันเนื่องศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า สามารถเจริญเติบโต และแพร่กระจายออกไปได้ ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจึงจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับตาม

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-02-01-51

สากลประเทศ โดยต้องมีการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อป้องกันหรือกำจัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้น ต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตร โดยใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ที่พัฒนาโดยองค์กรระหว่างประเทศ

องุ่น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Vitidacea ปัจจุบันผลสดองุ่นจากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การอนุญาตนำเข้าเพื่อการค้าจำเป็นต้องผ่านกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเสียก่อน จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชในเบื้องต้นปรากฏว่า มีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับผลสดองุ่นนำเข้าได้ หากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เข้มงวดแล้ว อาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับสินค้าที่นำเข้า เกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้า (เฉพาะผลสดเพื่อบริโภค) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพในการเป็นศัตรูพืชกักกัน และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าผลสดองุ่นจากประเทศออสเตรเลีย เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนในการประกาศทบทวนมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าองุ่นจากประเทศออสเตรเลีย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เอกสารงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ

2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง คำแนะนำสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

3. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม

4. คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC: International Plant Protection Convention)

วิธีการ

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of Pest Risk Analysis)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2553

สถานที่ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2551 ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชผลการดำเนินงานดังนี้ การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเนื่องมาจากการปรับปรุงแก้ไขกฎหมายด้านกักกันพืช โดยกำหนดให้ผลสดองุ่นมีสถานภาพเป็นสิ่งต้องห้าม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550) และตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 การนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าจำเป็นต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเสียก่อน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียเพื่อทราบชนิดศัตรูพืชกักกันและกำหนดแนวทางหรือมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมเพื่อป้องกันศัตรูพืชร้ายแรงที่อาจติดมากับผลสดองุ่นนำเข้า และเส้นทางที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามาคือผลสดองุ่นที่นำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลียเพื่อการบริโภค

ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากเอกสารวิชาการและจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของต่างประเทศได้ข้อมูลศัตรูพืชขององุ่นจากการศึกษารวบรวมรายงานจากทั่วโลกมีศัตรูพืชขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 373 ชนิด เป็นแมลง 166 ชนิด ไร 22 ชนิด ไวรัส 23 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด เชื้อรา 51 ชนิด ไส้เดือนฝอย 42 ชนิด ไฟโตพลาสมา 6 ชนิด และวัชพืช 49 ชนิด ซึ่งเป็นศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศออสเตรเลียจำนวน 120 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 45 ชนิด ไร 9 ชนิด ไส้เดือนฝอย 17 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด เชื้อรา 20 ชนิด แบคทีเรีย 7 ชนิด ไวรัส 14 ชนิด และวัชพืช 7 ชนิด สำหรับศัตรูองุ่นที่มีรายงานในประเทศไทยพบจำนวน 58 ชนิด แบ่งเป็น แมลง

28 ชนิด ไร 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด และวัชพืช 2 ชนิด

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียในขั้นตอนต่อไป จะดำเนินการในปีต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากเอกสารวิชาการและจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของต่างประเทศได้ข้อมูลศัตรูพืชขององุ่นจากการศึกษารวบรวมรายงานจากทั่วโลกมีศัตรูพืชขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 373 ชนิด เป็นแมลง 166 ชนิด ไร 22 ชนิด ไวรัส 23 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด เชื้อรา 51 ชนิด ไส้เดือนฝอย 42 ชนิด ไฟโตพลาสมา 6 ชนิด และวัชพืช 49 ชนิด ซึ่งเป็นศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศออสเตรเลียจำนวน 120 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 45 ชนิด ไร 9 ชนิด ไส้เดือนฝอย 17 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด เชื้อรา 20 ชนิด แบคทีเรีย 7 ชนิด ไวรัส 14 ชนิด และวัชพืช 7 ชนิด สำหรับศัตรูองุ่นที่มีรายงานในประเทศไทยพบจำนวน 58 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 28 ชนิด ไร 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด และวัชพืช 2 ชนิด โดยจะนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 1992. International Plant Protection Convention, 1992. FAO, Rome.

Anonymous. 1996. Guidelines for Pest Risk Analysis, 1996. ISPM No. 2, FAO, Rome.

Anonymous. 2004. Glossary of Phytosanitary terms, 2004. ISPM No. 5, FAO, Rome.

Anonymous. 2004. Pest Risk Analysis for Quarantine Pests Including Analysis of Environmental Risks Pest risk Analysis for Quarantine Pests, 2004. ISPM No. 11, FAO, Rome.

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium 2007 Edition. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศอินเดีย

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Grape from India

อลงกต โพธิ์ดี สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ ณัฏฐพร อุทัยมงคล วลัยกร รัตนเดชากุล
อดุลย์รัตน์ แคล้วคลาด
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศอินเดีย ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2551 -กันยายน 2552 ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อทราบชนิดศัตรูพืชกักกันที่อาจติดมากับผลสดองุ่นนำเข้าจากประเทศอินเดีย และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชข้อมูลศัตรูพืชขององุ่นจากการศึกษารวบรวมรายงานจากทั่วโลกมีศัตรูพืชขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 373 ชนิด ซึ่งเป็นศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศอินเดียจำนวน 114 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 50 ชนิด ไร 9 ชนิด ไส้เดือนฝอย 20 ชนิด เชื้อรา 21 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด สำหรับศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศไทยพบจำนวน 58 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 28 ชนิด ไร 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด และวัชพืช 2 ชนิด ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World Trade organization, WTO) ทำให้ประเทศสมาชิกต้องปฏิบัติตามข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตมนุษย์ สัตว์และพืช จากสิ่งปนเปื้อน สารพิษ หรือเชื้อโรคที่มีพืชหรือสัตว์เป็นตัวนำ เพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายอันเนื่องศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า สามารถเจริญเติบโต และแพร่กระจายออกไปได้ ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจึงจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับตาม

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-02-01-51

สากลประเทศ โดยต้องมีการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อป้องกันหรือกำจัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้น ต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตร โดยใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ที่พัฒนาโดยองค์กรระหว่างประเทศ

องุ่น มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vitis vinifera* Linn. จัดอยู่ในวงศ์ Vitidacea ปัจจุบันผลสดองุ่นจากทุกแหล่งจัดเป็นสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไขตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 การอนุญาตนำเข้าเพื่อการค้าจำเป็นต้องผ่านกระบวนการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเสียก่อน จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชในเบื้องต้นปรากฏว่า มีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับผลสดองุ่นนำเข้าได้ หากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เข้มงวดแล้ว อาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับสินค้าที่นำเข้า เกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้า (เฉพาะผลสดเพื่อบริโภค) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้รายชื่อศัตรูพืชที่มีศักยภาพในการเป็นศัตรูพืชกักกัน และกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมสำหรับการนำเข้าผลสดองุ่นจากประเทศอินเดีย เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนในการประกาศทบทวนมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าองุ่นจากประเทศอินเดีย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เอกสารงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ

2. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures: ISPM) ฉบับที่ 2 เรื่อง คำแนะนำสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช

3. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม

4. คู่มือสำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ตามแนวทางของอนุสัญญาอารักขาพืชระหว่างประเทศ (IPPC: International Plant Protection Convention)

วิธีการ

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 1: Initiation of Pest Risk Analysis)

ขั้นตอนที่ 2 การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 2: Pest Risk Assessment)

ขั้นตอนที่ 3 การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช (Stage 3: Pest risk management)

เวลาและสถานที่

เวลา เดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2553

สถานที่ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2551 ดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชผลการดำเนินงานดังนี้ การเริ่มต้นวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเนื่องมาจากการปรับปรุงแก้ไขกฎหมายด้านกักกันพืช โดยกำหนดให้ผลสดองุ่นมีสถานภาพเป็นสิ่งต้องห้าม (ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550) และตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ.2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 การนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการค้าจำเป็นต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดเงื่อนไขการนำเข้าเสียก่อน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศอินเดียเพื่อทราบชนิดศัตรูพืชกักกันและกำหนดแนวทางหรือมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสมเพื่อป้องกันศัตรูพืชร้ายแรงที่อาจติดมากับผลสดองุ่นนำเข้า และเส้นทางที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามาคือผลสดองุ่นที่นำเข้ามาจากประเทศอินเดียเพื่อการบริโภค

ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากเอกสารวิชาการและจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของต่างประเทศได้ข้อมูลศัตรูพืชขององุ่นจากการศึกษารวบรวมรายงานจากทั่วโลกมีศัตรูพืชขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 373 ชนิด เป็นแมลง 166 ชนิด ไร 22 ชนิด ไวรัส 23 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด เชื้อรา 51 ชนิด ไส้เดือนฝอย 42 ชนิด ไฟโตพลาสมา 6 ชนิด และวัชพืช 49 ชนิด ซึ่งเป็นศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศอินเดียจำนวน 114 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 50 ชนิด ไร 9 ชนิด ไส้เดือนฝอย 20 ชนิด เชื้อรา 21 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด สำหรับศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศไทยพบจำนวน 58 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 28 ชนิด ไร 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด และวัชพืช 2 ชนิด

สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชขององุ่นนำเข้าจากประเทศอินเดียในขั้นตอนต่อไป จะดำเนินการในปีต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากเอกสารวิชาการและจากการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของต่างประเทศได้ข้อมูลศัตรูพืชขององุ่นจากการศึกษารวบรวมรายงานจากทั่วโลกมีศัตรูพืชขององุ่นรวมทั้งสิ้นจำนวน 373 ชนิด เป็นแมลง 166 ชนิด ไร 22 ชนิด ไวรัส 23 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด แบคทีเรีย 13 ชนิด เชื้อรา 51 ชนิด ไส้เดือนฝอย 42 ชนิด ไฟโตพลาสมา 6 ชนิด และวัชพืช 49 ชนิด ซึ่งเป็นศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศอินเดียจำนวน 114 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 50 ชนิด ไร 9 ชนิด ไส้เดือนฝอย 20 ชนิด เชื้อรา 21 ชนิด แบคทีเรีย 4 ชนิด ไวรัส 7 ชนิด และวัชพืช 3 ชนิด สำหรับศัตรูพืชขององุ่นที่มีรายงานในประเทศไทยพบจำนวน 58 ชนิด แบ่งเป็น แมลง 28 ชนิด ไร 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด และวัชพืช 2 ชนิด โดยจะนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชในขั้นตอนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Anonymous. 1992. International Plant Protection Convention, 1992. FAO, Rome.

Anonymous. 1996. Guidelines for Pest Risk Analysis, 1996. ISPM No. 2, FAO, Rome.

Anonymous. 2004. Glossary of Phytosanitary terms, 2004. ISPM No. 5, FAO, Rome.

Anonymous. 2004. Pest Risk Analysis for Quarantine Pests Including Analysis of Environmental Risks Pest risk Analysis for Quarantine Pests, 2004. ISPM No. 11, FAO, Rome.

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium 2007 Edition. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแครอท

Study on Pest Risk Analysis for Importation of Carrot (*Daucus carota* L.)

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ ณัฏฐพร อุทัยมงคล วลัยกร รัตนเดชากุล
วรัญญา มาลี อลงกต โพธิ์ดี
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แครอท (Carrot: *Daucus carota* L.) เป็นพืชที่เจริญได้ดีในอากาศหนาว จัดอยู่วงศ์อัมเบลลิเฟอร์อี้ (Umbelliferae) มีแหล่งผลิตแครอทปริมาณมากที่สุดในโลก คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาได้แก่ สหพันธรัฐรัสเซีย สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐโปแลนด์ และ สหราชอาณาจักร ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้าแครอทในปี 2550 ปริมาณสูงสุดคือ สาธารณรัฐประชาชนจีน18,863,358.00 กิโลกรัม รองลงมาคือ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ ปริมาณ 770,611.55 กิโลกรัม และ 181,380.00 กิโลกรัม ตามลำดับ ผลการตรวจสอบศัตรูพืชบนแครอทนำเข้าจากต่างประเทศ ณ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง และท่าเรือกรุงเทพฯ ระหว่างเดือนเมษายน 2551 - กุมภาพันธ์ 2552 จำนวน 3 ประเทศ 13 ตัวอย่าง ได้แก่ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน พบเชื้อรา *Thielaviopsis thielavioides*, *Alternaria radicina., Rhizopus* sp.,*Geotichum* sp., *Ulocladium* sp. ออสเตรเลียพบเชื้อรา *Thielaviopsis thielavioides* และ *Fusarium solani* และนิวซีแลนด์ พบเชื้อรา *Phoma* sp.

จากผลการศึกษาการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของแครอทนำเข้า ในขั้นตอนการจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) โดยการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชจากรายงานและเอกสารวิชาการทั้งในประเทศ และต่างประเทศทั่วโลก พบศัตรูพืชของแครอท จำนวนทั้งสิ้น 296 ชนิด เป็นศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย 221 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง สามารถติดเข้ามา ตั้งรกราก และแพร่กระจายจนก่อให้เกิดความเสียหายถึงระดับเศรษฐกิจได้ จำนวน 25 ชนิด จึงจำเป็นต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนการส่งออกที่เหมาะสม สำหรับแมลงหรือไร เช่น การรมยาด้วยเมทิลโบร์ไมด์ที่ อัตรา 32 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียสที่ประเทศต้นทาง การจัดการเชื้อสาเหตุโรคพืชสามารถลดความ เสี่ยงได้โดยการตรวจสอบ และกำจัดตั้งแต่ในแปลงปลูกก่อนเก็บเกี่ยว การจัดการหลัง

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-02-01-51

การเก็บเกี่ยวรวมถึงก่อนการส่งออกกำหนดมาตรการให้ตรวจสอบและระบุคำรับรองลงในใบรับรองสุขอนามัยพืชให้ปราศจากศัตรูพืชกักกันดังกล่าวและเมื่อสินค้ามาถึงจะถูกสุ่มตรวจ ณ จุดนำเข้า หากตรวจพบศัตรูพืชกักกันจะถูกทำลายหรือให้ส่งกลับ กรณีตรวจพบศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกันทำการกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวด้วยวิธีการที่เหมาะสม

คำนำ

จากการที่ประเทศไทยเข้าเป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (World Trade organization, WTO) ทำให้ประเทศสมาชิกต้องปฏิบัติตามข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement of Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการปกป้องชีวิตมนุษย์ สัตว์และพืช จากสิ่งปนเปื้อน สารพิษ หรือเชื้อโรคที่มีพืชหรือสัตว์เป็นตัวนำ เพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายอันเนื่องศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตรนำเข้า สามารถเจริญเติบโต และแพร่กระจายออกไปได้ ดังนั้นประเทศผู้นำเข้าจึงจำเป็นต้องมีการใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับตามสากลประเทศ โดยต้องมีการทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเพื่อป้องกันหรือกำจัดความเสียหายที่อาจเกิดขึ้น ต้องมีการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของสินค้าเกษตร โดยใช้เทคนิคและวิธีการที่เหมาะสม ที่พัฒนาโดยองค์กรระหว่างประเทศ

สถานการณ์การผลิตแครอทในต่างประเทศทั่วโลก พบว่าประเทศที่มีปริมาณการผลิตมากที่สุด เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน สหพันธรัฐรัสเซีย สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐโปแลนด์ และ สหราชอาณาจักร ตามลำดับ (USDA, 2007) สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้าแครอทจากหลายประเทศ โดยเฉพาะแครอทนำเข้าเพื่อบริโภค ได้แก่ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ เป็นต้น (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2550) จากการศึกษารวบรวมข้อมูลศัตรูพืชในเบื้องต้นปรากฏว่า มีศัตรูพืชร้ายแรงหลายชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้มีโอกาสที่จะติดเข้ามากับแครอทนำเข้าได้ มาตรการกักกันพืชที่ใช้ควบคุมการนำเข้าแครอทปัจจุบันได้อาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 แครอทจัดอยู่ในประเภทสิ่งกำกัด หากประเทศไทยไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เข้มงวดแล้ว อาจก่อให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชหลายชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศติดมากับสินค้าที่นำเข้า เกิดการแพร่กระจายและเพิ่มปริมาณจนเกิดเป็นการระบาดของศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างใหญ่หลวง ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาในเบื้องต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของแครอทนำเข้า เพื่อใช้เป็น

ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนในการประกาศทบทวนมาตรการทางสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศ

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์และอื่น ๆ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Nutrient Agar (NA) , Potato Dextrose Agar (PDA)
2. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สำหรับการแยกเชื้อสาเหตุโรคพืชและแมลง
3. วัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช
4. ชุดคอมพิวเตอร์ที่ติดตั้งระบบอินเตอร์เน็ต
5. เครื่องพิมพ์ หมึกสี และขาวดำ
6. แผ่นเก็บข้อมูล กระดาษ A4
7. แผ่นข้อมูล Crop Protection Compendium (CABI, 2007)
8. เอกสารงานวิจัยทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุม และสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลการประชุมอภิปรายจากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก
9. ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะด้านโรคพืชและแมลงศัตรูพืช ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

วิธีการ

1. **การรวบรวมข้อมูลพืช**

การรวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืชแครอท ที่จะดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยง โดยทำการศึกษา ค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลของแครอทจากฐานข้อมูล เอกสาร และรายงานทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลทางอิเลคโทนิค หรือเว็บไซท์ ต่างๆ ทั่วโลก เพื่อศึกษาข้อมูลทางอนุกรมวิธาน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ การจำแนกชีววิทยา การปลูก การเก็บเกี่ยว และสถิติการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศ เป็นต้น

2. **การตรวจสอบเชื้อโรคและศัตรูพืชของแครอทที่นำเข้ามาในราชอาณาจักร** (Interception)

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างแครอทนำเข้าจากต่างประเทศ ณ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง และท่าเรือกรุงเทพฯ ระหว่างเดือนเมษายน 2551 ถึง กุมภาพันธ์ 2552 ในอัตรา 2 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับมาตรฐานการสุ่มตัวอย่างของผักและผลไม้ของสหรัฐอเมริกา (USDA, 2004) แล้วนำมาตรวจสอบศัตรูพืชด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อตรวจหาศัตรูพืชที่อาจติดมากับแครอทนำเข้า เช่น ตัวอ่อน หนอน ไข่ ดักแด้ อาการจุด เน่า จากนั้นทำการจำแนกชนิดของศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศ

การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis, PRA) ได้ดำเนินการตามมาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standard for Phytosanitary Measures, ISPM) ฉบับที่ 11 แก้ไขครั้งที่ 1 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมถึงการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม (Pest Risk Analysis for Quarantine Pests Including Analysis of Environmental Risks) (FAO, 2004) โดยการดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักที่สำคัญ ดังนี้

3.1 การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Initiation of pest risk analysis)

ขั้นตอนนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อกำหนดศัตรูพืช และเส้นทางศัตรูพืช ซึ่งเกี่ยวข้องกับทางกักกันพืช และทำการพิจารณาการวิเคราะห์ความเสี่ยงที่สัมพันธ์กับพื้นที่หนึ่งที่กำหนดซึ่งจะต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช ดำเนินการโดยการรวบรวมข้อมูลศัตรูพืชของแครอท ที่จะดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงจากฐานข้อมูล เอกสาร และรายงานทั้งในและต่างประเทศ ตำราวิชาการ วารสารวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ ข้อมูลทางอิเล็กโทนิก หรือเว็บไซท์ ต่างๆ ทั่วโลกซึ่งเป็นข้อมูลล่าสุดที่มีรายงานจนถึงปัจจุบันนี้และเชื่อถือได้ เพื่อศึกษาข้อมูลศัตรูพืชของแครอท ได้แก่ ชื่อวิทยาศาสตร์ ข้อมูลทางชีววิทยา แหล่งแพร่กระจาย ลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช ความสำคัญของศัตรูพืชและความเสียหายทางเศรษฐกิจ วิธีควบคุมและการป้องกันกำจัด รวมทั้งข้อมูลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประเทศ ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของแครอทมาก่อนแล้ว ข้อมูลดังกล่าวจะนำมาจัดทำบัญชีรายชื่อและจำแนกชนิดของศัตรูแครอท (Pest list and Pest Identification) ที่มีรายงานพบในต่างประเทศ จากนั้นระบุเส้นทาง (Pathway) ซึ่งเกี่ยวข้องกับทางกักกัน โดยทำการพิจารณาการวิเคราะห์ความเสี่ยงโดยใช้หลักความสัมพันธ์ของชนิดศัตรูแครอทกับเส้นทางศัตรูพืช ในกรณีนี้คือ ศัตรูพืชที่สามารถติดมากับหัวหรือรากแครอท และพิจารณาการวิเคราะห์ความเสี่ยงที่สัมพันธ์กับพื้นที่ในประเทศไทย โดยพื้นที่บางแห่งมีพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืชปรากฏอยู่ และมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรของศัตรูพืชซึ่งอาจจะติดเข้ามาพร้อมกับการนำเข้าแครอท เพื่อบริโภค

ผลการวิเคราะห์ในขั้นตอนนี้นำมาดำเนินการจำแนกศัตรูพืชและเส้นทางศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องและศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทย และเก็บรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ รวมทั้งจำแนกและคัดเลือกศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชที่จะต้องดำเนินมาตรการสุขอนามัยพืช หรือ ชนิดศัตรูพืชที่เป็นตัวแทนของศัตรูพืชที่จำเป็นต้องใช้มาตรการสุขอนามัยพืช โดยอาจเป็นศัตรูพืชชนิดใดชนิดหนึ่งที่เฉพาะเจาะจง หรือศัตรูพืชที่มีโอกาสปะปนมากับเส้นทางศัตรูพืช

3.2 **การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช** (Pest risk assessment) ประกอบด้วยการจำแนกประเภทศัตรูพืช (Pest categorization) เพื่อตัดสินว่ามีศัตรูพืชชนิดใดอยู่ภายใต้หลักเกณฑ์ที่จะเป็นศัตรูพืชกักกันหรือไม่ การประเมินความเสี่ยงที่จะต้องดำเนินการต่อไปหลังจากนั้น คือ การประเมินโอกาสเป็นไปได้ที่ศัตรูพืชจะเข้ามา (Introduction) การเข้ามาตั้งรกรากอย่างถาวร (Establishment) การแพร่ระบาด (Spread) และศักยภาพที่จะก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจ (Economic Consequences) โดยอาศัยแนวทางการวิเคราะห์ความเสี่ยงของประเทศสหรัฐอเมริกามาปรับใช้ (USDA, 2000) ดังนี้

3. 2. 1 **ประเมินผลกระทบที่ตามมาภายหลังจากศัตรูพืชกักกันเข้ามา (Consequences of Introduction)** โดยพิจารณาความเสี่ยงจากองค์ประกอบ 5 ข้อ และกำหนดความเสี่ยงเชิงปริมาณดังนี้ ความเสี่ยงต่ำ (1 จุด) ปานกลาง (2 จุด) สูง (3 จุด) และรวมความเสี่ยงแต่ละองค์ประกอบเข้าด้วยกัน

องค์ประกอบที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างสภาพภูมิอากาศกับพืชอาศัย (Climate-Host Interaction) พิจารณาผลกระทบที่จะตามมาของศัตรูพืชชนิดใหม่กับสภาพภูมิอากาศและพืชอาศัยในประเทศไทย ทั้งสภาพที่มีชีวิต(biotic)และไม่มีชีวิต(abiotic) ซึ่งเป็นปัจจัยในการแพร่ขยายพันธุ์ โดยกำหนดให้มีค่า “Thai Plant Hardiness Zone” (Thai Meteorological Department, 1998-2007) ซึ่งแบ่งเป็น 5 โซน คือค่าสูงสุด-ต่ำสุด ดังนี้

โซน 1 ปริมาณน้ำฝน (1,525-1,035 มิลลิเมตรต่อปี), ความชื้นสัมพันธ์ (84-55 เปอร์เซ็นต์), อุณหภูมิอากาศ (39-12 องศาเซลเซียส)

โซน 2 ปริมาณน้ำฝน (1,718-1,225 มิลลิเมตรต่อปี), ความชื้นสัมพันธ์ (83-60 เปอร์เซ็นต์), อุณหภูมิอากาศ (39-15 องศาเซลเซียส)

โซน 3 ปริมาณน้ำฝน (1,546 -921 มิลลิเมตรต่อปี), ความชื้นสัมพันธ์ (79-61เปอร์เซ็นต์), อุณหภูมิอากาศ (39-16 องศาเซลเซียส)

โซน 4 ปริมาณน้ำฝน (2,065-1,616 มิลลิเมตรต่อปี), ความชื้นสัมพันธ์ (83-61 เปอร์เซ็นต์), อุณหภูมิอากาศ (38-18 องศาเซลเซียส)

โซน 5 ปริมาณน้ำฝน (2,625 -1,940 มิลลิเมตรต่อปี), ความชื้นสัมพันธ์ (86-70 เปอร์เซ็นต์), อุณหภูมิอากาศ (37-19 องศาเซลเซียส)

ความเสี่ยงต่ำ (1) สภาพแวดล้อมในถิ่นฐานเดิมคล้ายคลึงกับ plant hardiness 1 โซน

ความเสี่ยงปานกลาง (2) สภาพแวดล้อมในถิ่นฐานเดิมคล้ายคลึงกับ plant hardiness 2-3 โซน

ความเสี่ยงสูง (3) สภาพแวดล้อมในถิ่นฐานเดิมคล้ายคลึงกับ plant hardiness มากกว่า 4 โซน

ถ้าศัตรูพืชไม่อยู่ในหลักเกณฑ์ดังกล่าว การวิเคราะห์ความเสี่ยงจะหยุด ณ ขั้นตอนนี้

องค์ประกอบที่ 2 ชนิดพืชอาศัย (Host range) ความเสี่ยงขึ้นอยู่กับความสามารถในการดำรงชีพ การแพร่พันธุ์ และศักยภาพในการทำลายพืชของ arthropods สัมพันธ์กับพืชอาศัย สำหรับเชื้อสาเหตุของโรคขึ้นอยู่กับความหลากหลายของพืชอาศัย ความรุนแรง และความสามารถในการก่อให้เกิดโรค มีหลักเกณฑ์ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ (1) ศัตรูพืชสามารถเข้าทำลายพืชหนึ่งชนิดหรือหลายชนิดในจีนัสเดียวกัน

ความเสี่ยงปานกลาง(2) ศัตรูพืชสามารถเข้าทำลายพืชหลายชนิดที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน

ความเสี่ยงสูง (3) ศัตรูพืชเข้าทำลายพืชหลายชนิดและหลายวงศ์

องค์ประกอบที่ 3 ศักยภาพการแพร่กระจาย (Dispersal potential) พิจารณาจากรูปแบบการขยายพันธุ์ ความสามารถในการเคลื่อนที่ ปัจจัยส่งเสริมการแพร่กระจาย (ลม น้ำ พาหะ มนุษย์ ฯลฯ) มีหลักเกณฑ์ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ (1) ศัตรูพืชมีการสืบพันธุ์ออกลูกหลานต่ำ มีการแพร่กระจายได้น้อย

ความเสี่ยงปานกลาง(2) ศัตรูพืชมีการสืบพันธุ์ได้ดี มีการแพร่กระจายว่องไว

ความเสี่ยงสูง(3) ศัตรูพืชมีลูกหลานหลายรุ่นในหนึ่งปี มีลูกมาก และมีการแพร่กระจายเร็วและไกล เช่นมากกว่า 10 กิโลเมตรต่อปีด้วยความสามารถของตัวมันเอง สามารถแพร่พันธุ์โดยอาศัยธรรมชาติ ลม น้ำ พาหะ หรือมนุษย์

องค์ประกอบที่ 4 ผลกระทบทางเศรษฐกิจ (Economic impact) มีเกณฑ์พิจารณาคือทำให้ผลผลิตลดลง ทำให้พืชตายหรือเป็นพาหะนำโรค เพิ่มต้นทุนการผลิต ผลผลิตลดลง สูญเสียตลาดส่งออกเนื่องจากการมีศัตรูพืชกักกัน ได้มีการกำหนดดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ (1) ศัตรูพืชไม่อยู่ภายใต้หลักเกณฑ์ หรืออยู่ใต้หลักเกณฑ์กรณีเดียว

ความเสี่ยงปานกลาง (2) ศัตรูพืชอยู่ภายใต้หลักเกณฑ์ มากกว่าหรือยู่ใน 2 หลักเกณฑ์

ความเสี่ยงสูง (3) ศัตรูพืชอยู่ภายใต้ทุกหลักเกณฑ์

องค์ประกอบที่ 5 ผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม (Environmental impact) มีเกณฑ์พิจารณาคือผลกระทบเป็นอย่างมาก เช่น การทำลายสภาพนิเวศวิทยา การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพ การมีผลกระทบรุนแรงต่อสิ่งแวดล้อม การคุกคามสิ่งมีชีวิตที่ใกล้สูญพันธุ์ ต้องมีมาตรการกำจัดศัตรูพืชหลังจากศัตรูพืชกักกันเข้ามาแพร่ระบาดในประเทศไทย ได้มีการกำหนดดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ (1) ศัตรูพืชไม่อยู่ใต้หลักเกณฑ์

ความเสี่ยงปานกลาง(2) ศัตรูพืชอยู่ภายใต้หลักเกณฑ์ 1 หลักเกณฑ์

ความเสี่ยงสูง (3) ศัตรูพืชอยู่ภายใต้หลักเกณฑ์ มากกว่าหรืออยู่ใน 2 หลักเกณฑ์

สรุป ประเมินผลกระทบที่ตามมาภายหลังจากศัตรูพืชกักกันเข้ามา (Assess consequences of introduction) ของทั้ง 5 องค์ประกอบ นำมาพิจารณาว่าเป็นปัจจัยด้านชีววิทยาที่ทำให้ศัตรูพืชกักกันมีศักยภาพในการดำรงชีพถาวร แพร่กระจาย และมีผลต่อเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ	มีผลรวม 5-8 จุด
ความเสี่ยงปานกลาง	มีผลรวม 9-12 จุด
ความเสี่ยงสูง	มีผลรวม 13-15 จุด

3. 2. 2 **ประเมินโอกาสในการเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์และดำรงชีพอย่างถาวร** (Rating for the likelihood of introduction) โดยพิจารณาจากโอกาสศัตรูพืชจะมีชีวิตอยู่รอด และการเคลื่อนย้ายไปสู่สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมและพบพืชอาศัย ซึ่งองค์ประกอบที่ 6 นี้ พิจารณาจากความเสี่ยง 6 ประการ ดังนี้

องค์ประกอบที่ 6. 1 **ปริมาณการนำเข้าในรอบหนึ่งปี** (Quantity of commodity imported annually) โอกาสที่ศัตรูพืชจากต่างประเทศเข้ามาขึ้นอยู่กับศัตรูพืชที่ปะปนมากับสินค้า

ความเสี่ยงต่ำ (1)	น้อยกว่า 10	ตู้คอนเทนเนอร์ต่อปี
ความเสี่ยงปานกลาง (2)	10-100	ตู้คอนเทนเนอร์ต่อปี
ความเสี่ยงสูง (3)	มากกว่า 100	ตู้คอนเทนเนอร์ต่อปี

องค์ประกอบที่ 6. 2 **การมีชีวิตรอดของศัตรูพืชจากการกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว** (Survive postharvest treatment) ได้แก่ การบริหารจัดการ การกำจัดศัตรูพืชในสินค้าที่จะส่งออก เช่น การคัดแยก ล้าง การใช้สารเคมี การเก็บรักษาในห้องเย็น ฯลฯ ถ้าไม่มีวิธีกำจัดศัตรูพืชจะประเมินความเสี่ยงให้อยู่ในระดับสูง

องค์ประกอบที่ 6. 3 **การรอดชีวิตของศัตรูพืชระหว่างการขนส่ง** (Survive shipment) พิจารณาที่การขนส่งที่ดำเนินการอยู่ปกติในปัจจุบัน

องค์ประกอบที่ 6. 4 **การที่ไม่สามารถตรวจพบศัตรูพืช ณ จุดนำเข้า** (Not be detected at the port of entry) หากมาตรการตรวจหาศัตรูพืชที่มีอยู่แล้วไม่มีประสิทธิภาพพอจะกำหนดให้ศัตรูพืชชนิดนั้นความเสี่ยงสูง

องค์ประกอบที่ 6. 5 **การนำเข้าหรือเคลื่อนย้ายสินค้าไปที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของศัตรูพืช** (Imported or moved subsequently to an area with an environment suitable for survival) พิจารณาตำแหน่งและสภาพภูมิประเทศ

ที่คาดว่าสินค้าจะนำมาวางจำหน่ายเพื่อประเมินว่าสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศของพื้นที่นั้นมีความเหมาะสมต่อการรอดชีวิตของศัตรูพืชที่ติดมากับสินค้านำเข้าได้หรือไม่

องค์ประกอบที่ 6. 6 **การเข้ามาสัมผัสกับพืชอาศัยที่เหมาะสมเพื่อการขยายพันธุ์** (Come into contact with host material suitable for reproduction) ถึงแม้ว่าสินค้าซึ่งมีศัตรูพืชทำลายจะมาถึงพื้นที่มีสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศความเหมาะสมต่อการรอดชีวิต พืชอาศัยที่เหมาะสมและแหล่งขยายพันธุ์เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ศัตรูพืชมีชีวิตอยู่รอด ศัตรูพืชแต่ละชนิดต้องพิจารณาความหลากหลายของพืชอาศัย การพิจารณาขึ้นอยู่กับความหลากหลายของพืชอาศัยของศัตรูพืชนั้น

โดยการประเมินองค์ประกอบที่ 6.1-6.6 ใช้หลักเกณฑ์ ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ (1) น้อยกว่า 0.1% (น้อยกว่า 1 ใน 1,000)

ความเสี่ยงปานกลาง (2) ระหว่าง 0.1% - 10% (ระหว่าง 1 ใน 1,000 ถึง 1 ใน 10)

ความเสี่ยงสูง (3) มากว่า 10% (มากกว่า 1 ใน 10)

สรุป ประเมินโอกาสในการเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์และดำรงชีพอย่างถาวร (Rating for the likelihood of introduction) เป็นการรวมผลขององค์ประกอบ 6 ข้อพิจารณาตาม ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ มีผลรวม 6-9 จุด

ความเสี่ยงปานกลาง มีผลรวม 10-14 จุด

ความเสี่ยงสูง มีผลรวม 15-18 จุด

จากนั้นสรุปผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชที่ต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืชมาจัดการ (Conclusion/ Pest Risk Potential: Pests Requiring Phytosanitary Measures) เป็นการรวมการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชแต่ละชนิดระหว่างผลรวมการประเมินผลกระทบที่ตามมาภายหลังจากศัตรูพืชกักกันเข้ามา กับผลรวมการประเมินโอกาสในการเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์และดำรงชีพอย่างถาวร โดยกำหนด ดังนี้

ความเสี่ยงต่ำ 11-18 จุด

มีหลักเกณฑ์ คือ ไม่ต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงอื่นมาดำเนินการ วิธีการสุ่มตรวจสินค้า ณ จุดนำเข้ามีความเพียงพอและเชื่อมั่นได้ว่าสินค้าปลอดจากศัตรูพืช

ความเสี่ยงปานกลาง 19-26 จุด

มีหลักเกณฑ์ คือ อาจมีความจำเป็นต้องมีมาตรการจัดการความเสี่ยงอื่นมาดำเนินการ

ความเสี่ยงสูง 27-33 จุด

มีหลักเกณฑ์ คือ มีความจำเป็นต้องใช้มาตรการจัดการความเสี่ยงอื่นมาดำเนินการ การสุ่มตรวจสินค้า ณ จุดนำเข้าไม่มีความเพียงพอและเชื่อมั่นได้ว่าสินค้าปลอดจากศัตรูพืช

3.3 **การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช** (Pest risk management) เกี่ยวข้องกับการกำหนดทางเลือกสำหรับการจัดการความเสี่ยง ทั้งนี้เพื่อลดความเสี่ยงที่ระบุในขั้นตอนที่ 2 ทางเลือกเหล่านี้จะถูกประเมินถึงประสิทธิภาพ ความเป็นไปได้ และผลกระทบ เพื่อที่จะคัดเลือกหาทางเลือกที่เหมาะสมที่สุดและกำหนดมาตรการจัดการความเสี่ยงทั้งทางกฎหมาย และทางวิชาการภายใต้บทบัญญัติของพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 สำหรับการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศ

ระยะเวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2550 สิ้นสุด กันยายน 2552 รวม 2 ปี

กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมข้อมูลพืช

แครอท (carrot) มีชื่อวิทยาศาตร์ว่า *Daucus carota* L. อยู่ในวงศ์เอเปียซีอี้ (Apiaceae) หรือ Umbelliferae มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบเอเชียกลางจนถึงทางตะวันออก ต่อมาแพร่หลายเข้าไปในยุโรปและประเทศจีน แครอทเป็นพืชสองฤดู โดยฤดูแรกเจริญทางต้น ใบ และราก ฤดูที่สองจะเจริญทางดอก และเมล็ด ลักษณะลำต้นเป็นแผ่นใบ จะเจริญจากลำต้น เป็นกลุ่มมีก้านใบยาว ประกอบด้วยเปลือกบาง(Periderm) และส่วนของเนื้อ (Cortex) ซึ่งประกอบด้วยท่ออาหาร และเป็นแหล่งเก็บอาหารสำรอง ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ 45-65% ของหัว เนื้อสีขาว เหลือง ส้ม แดง ม่วงและดำ ส่วนของแกน (inner core) ประกอบด้วยท่อน้ำ(xylem) และแกน (pith) แครอทสายพันธุ์ที่มีคุณภาพสูงจะมีแกนขนาดเล็ก และมีสีเดียวกับเนื้อหรือมีส่วนของเนื้อมากกว่าส่วนของแกน การปลูกฤดูที่สองเพื่อผลผลิตเมล็ดพันธุ์ ลำต้นจะยืดตัว สร้างก้านดอกยาว 2-4 ฟุต บนยอดมีช่อดอก ซึ่งช่อแรกจะเจริญจากส่วนกลางของลำต้น ต่อจากนั้นช่ออื่นๆ จะเจริญตาม การผสมเกสรจะเป็นแบบผสมข้าม ส่วนใหญ่แมลงเป็นตัวช่วยผสมเกสร โดยทั่วไปจะแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ตามขนาด และรูปทรงของหัว หรือการตลาด หรือการแปรรูป เช่น Chantenay (อายุเก็บเกี่ยว 80-180 วัน) , Imperator (อายุเก็บเกี่ยว 100-120 วัน) , danvers (อายุเก็บเกี่ยว 80-120 วัน) หรือ Nantes

types. (อายุเก็บเกี่ยว 70-120 วัน) สายพันธุ์เหล่านี้จะมีเนื้อสีส้ม สามารถใช้ประกอบอาหารและแปรรูป แครอทเป็นพืชที่เจริญได้ดีในเขตหนาว ชอบสภาพดินที่ร่วนซุย หน้าดินลึก มีอินทรีย์วัตถุสูง ระบายน้ำได้ดี และค่อนข้างเป็นกรด PH 6.5-7.0 ซึ่งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือ เมล็ดจะงอกได้ดีในอุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตจะอยู่ระหว่าง 25-28 องศาเซลเซียส ในกรณีที่อุณหภูมิสูงกว่า 28 องศาเซลเซียสการเจริญของใบจะลดลง และอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญของหัวอยู่ระหว่าง 18-21 องศาเซลเซียส (นิพนธ์, 2545)

สถานการณ์การผลิตแครอทในต่างประเทศทั่วโลก ปี 2003-2005 มีปริมาณการผลิตมากที่สุด เรียงลำดับจากมากไปหาน้อย คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน (34%) สหพันธรัฐรัสเซีย (7%) สหรัฐอเมริกา (7%) สาธารณรัฐโปแลนด์ (4%) และสหราชอาณาจักร(3%) ตามลำดับ ส่วนประเทศที่มีการส่งออกปริมาณแครอทสูงสุด เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยคือ สาธารณรัฐประชาชนจีน เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา เบลเยียม และฝรั่งเศส ตามลำดับ และมูลค่าการส่งออกแครอทคือ สาธารณรัฐประชาชนจีน สหรัฐอเมริกา เนเธอร์แลนด์ อิตาลี และสเปน ตามลำดับ (USDA, 2007; USDA, 2005) สำหรับประเทศไทยมีการการนำเข้าแครอทจากหลายประเทศ ได้แก่ สาธารณรัฐประชาชนจีน ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ โดยการนำเข้าแครอทปริมาณสูงสุด ในปี 2550 คือ ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนปริมาณ 18,863,358.00 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 272,472,445.70 บาท รองลงมาได้แก่ประเทศออสเตรเลีย ปริมาณ 770,611.55 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 11,574,860.00 และนิวซีแลนด์ ปริมาณ 181,380.00 กิโลกรัม เป็นมูลค่า 2,524,314.00 บาท ตามลำดับ (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2550)

2. **การตรวจสอบเชื้อโรคและศัตรูพืชของแครอทที่นำเข้ามาในราชอาณาจักร** (Interception)

ผลจากตรวจสอบศัตรูพืชบนแครอทนำเข้าจากต่างประเทศ ณ ด่านตรวจพืชลาดกระบังและท่าเรือกรุงเทพฯ ระหว่างเดือน เมษายน 2551 ถึง กุมภาพันธ์ 2552 รวมทั้งสิ้น 13 ตัวอย่าง ได้แก่ แครอทนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน 8 ตัวอย่าง ปริมาณ 240,000 กิโลกรัมพบเชื้อรา *Thielaviopsis thielavioides*, *Alternaria radicina., Rhizopus* sp.,*Geotichum* sp., *Ulocladium* sp. ออสเตรเลีย 2 ตัวอย่าง ปริมาณ 26,700 กิโลกรัมพบเชื้อรา *Thielaviopsis thielavioides* และ *Fusarium solani* และนิวซีแลนด์ 3 ตัวอย่าง ปริมาณ 78,000 กิโลกรัม พบเชื้อรา *Phoma* sp.

3. **การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศ**

3. 1 **การเริ่มต้นการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช** (Initiation of pest risk analysis)

จุดเริ่มต้นของการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำแครอทจากต่างประเทศเข้ามาในประเทศไทย เกิดขึ้นจากการทบทวนด้านนโยบายเพื่อปรับปรุงมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับ

การนำเข้าแครอทจากต่างประเทศให้รัดกุมยิ่งขึ้น (PRA initiated by the review or revision of a policy) เนื่องจากมาตรการควบคุมการนำเข้าแครอท ปัจจุบันอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 แครอทจัดเป็นพืชสิ่งกำกัด การนำเข้าต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย อย่างไรก็ตาม การนำเข้าที่มีใบรับรองสุขอนามัยพืช แต่ที่มิได้มีการระบุว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกันตลอดจนมาตรการทางกักกันพืชกำกับมาด้วยจึงทำให้แครอทนำเข้ายังมีความเสี่ยงที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช เพื่อทราบว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยพื้นที่วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Identification of PRA area) ที่กำหนดในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแครอท คือ “ประเทศไทย”

พื้นที่ที่อยู่ในอันตราย (Endangered area) ได้แก่ พื้นที่หนึ่งพื้นที่ใดในประเทศไทย ซึ่งมีปรากฏอยู่ของพืชอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของศัตรูพืช และมีปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวรของศัตรูพืชซึ่งอาจจะติดเข้ามากับการนำเข้า โดยเส้นทาง(Pathway) ที่ศัตรูพืชจะติดเข้ามา คือ ส่วนหัวหรือรากของแครอท ที่ปลูกเป็นการค้านำเข้ามาจากต่างประเทศ เพื่อการบริโภค

จากการสืบค้นข้อมูลของประเทศที่เคยดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของแครอทมาก่อนแล้ว พบว่า ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้รายงานว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน คือ *Meloidogyne ethiopica* ซึ่งมีความเสี่ยงปานกลางสามารถติดมากับเบบี้แครอทปลอกเปลือกจากเคนยา และเบบี้แครอทจากแซมเบีย (USDA, 2007; Porsche, 2006; Lakin, 2005) และ Davi *et.al* (2004) ได้รายงานว่าไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne fallax*) ซึ่งมีลักษณะสัญฐานวิทยาใกล้เคียงกับ *M. chitwoodi* นั้นยังไม่ปรากฏพบในสหรัฐอเมริกามีความเสี่ยงที่ติดมากับแครอทได้ อีกทั้งการนำเข้าแครอทจากนิวซีแลนด์ไปยังสหรัฐอเมริกา ต้องมีการตรวจสอบและรับรองว่าปลอดจากไรศัตรูพืช *Halotydeus destructor* เป็นต้น ส่วนประเทศจาไมกา มีรายงานพบว่าแบคทีเรีย *Xanthomonas camprestris* pv. *carotae* และเชื้อรา *Leveillula taurica* ซึ่งมีความเสี่ยงปานกลางสามารถติดมากับแครอทนำเข้าจากคอสตาริกา (MOA, 2005)

3.2 **การประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช** (Pest risk assessment)

การจัดกลุ่มศัตรูพืช (Pest categorization) **ที่พบบนส่วนหัวหรือรากของแครอท**

ผลการศึกษาข้อมูลศัตรูพืชของแครอทโดย พบว่า มีสิ่งมีชีวิตทั้งที่รายงานเป็นศัตรู และไม่เป็นศัตรูของแครอท รวมทั้งสิ้นจำนวน 296 ชนิด เป็นแมลง 72 ชนิด ไร 4 ชนิด ไส้เดือนฝอย 35 ชนิด หอยทาก 2 ชนิด เชื้อรา 112 ชนิด แบคทีเรีย 16 ชนิด ไวรัส 19 ไวรอยด์ 1 ชนิด ไฟโตพลาสมา 1

ชนิด วัชพืช 36 ชนิด โดยเป็นศัตรูที่มีรายงานพบในประเทศไทย 77 ชนิด เป็น แมลง 12 ชนิด ไร 2 ชนิด หอยทาก 1 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด เชื้อรา 39 ชนิด ไส้เดือนฝอย 12 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไวรอยด์ 1 ชนิด ไฟโตรพลาสมา 1 ชนิด วัชพืช 4 ชนิด

ในจำนวนนี้ศัตรูพืชที่ไม่มีรายงานพบในประเทศไทยและสามารถติดเข้ามากับรากของแครอทนำเข้า เพื่อการบริโภค ซึ่งที่มีศักยภาพเป็นศัตรูกักกัน จำนวน 25 ชนิด จากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันแต่ละชนิด ในขั้นตอนการประเมินผลกระทบที่ตามมาภายหลังจากศัตรูพืชกักกันเข้ามา และโอกาสในการเข้ามาเจริญแพร่พันธุ์และดำรงชีพอย่างถาวร พบว่ามีความเสี่ยงปานกลาง ได้แก่ แมลง *Psila rosae, Napomyza carotae, Naupactus leucoloma*, *Listronotus oregonensis, Listronotus texanus* ไร *Halotydeus destructor* ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne fallax*, *Meloidogyne ethiopica, Ditylenchus destructor, Nacobbus aberrans, Heterodera schachtii*, *Heterodera carotae,* แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv.*carotae*, *Pseudomonas marginalis* pv.*marginalis*, *Pseudomonas viridiflava* เชื้อรา *Chalara elegans, Phymatotrichopsis omnivore, Mycocentrospora acerina*, *Pythium sulcatum, Pythium violae, Phytophthora megasperma*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora medicaginis, Fusarium culmorum*

3.3 **การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืช** (Pest Risk Management)

ผลการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแครอท จำเป็นอย่างยิ่งต้องปรับเปลี่ยนมาตรการสุขอนามัยที่ใช้ควบคุมการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศในปัจจุบัน เนื่องจากพบมีศัตรูพืชกักกัน 25 ชนิด ซึ่งจำเป็นต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยงเพื่อมิให้ศัตรูพืชกักกันมีโอกาสติดกับแครอทนำเข้าและแพร่ระบาดในประเทศไทยได้ โดยกำหนดให้แครอทจากทุกแหล่งทั่วโลกเป็นสิ่งกำกัด ซึ่งอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 การนำเข้าต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชจากประเทศต้นทาง และมีการรับรองปลอดศัตรูพืชกักกัน 25 ชนิด

การจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน (Risk management) ควรจะประกอบด้วยมาตรการดังนี้

การจัดการในแหล่งผลิตก่อนการเก็บเกี่ยวได้แก่ 1). แหล่งผลิตแครอทต้องปราศจากแมลง ไร ไส้เดือนฝอย เชื้อรา และแบคทีเรีย ที่เป็นศัตรูพืชกักกันทั้ง 25 ชนิด โดยมีโปรแกรมจัดการบริหารควบคุมศัตรูพืชในแปลงปลูกอย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การเขตกรรรม การพ่นสารเคมีกำจัดแมลง เชื้อรา และวัชพืช เป็นต้น 2). การติดตามตรวจสอบในแปลง เพื่อสำรวจศัตรูพืชกักกันในแปลงปลูก 3). และสุ่มตรวจสอบในห้องปฏิบัติการก่อนการส่งออก

การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อลดความเสี่ยงของศัตรูพืชกักกันที่ทำลายบนหัวแครอท ได้แก่ 1). ต้องล้างหัวแครอทด้วยน้ำให้สะอาดจนกระทั้งหัวแครอทปราศจากดิน และปราศจากสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ 2). ปฏิเสธการเก็บและบรรจุหีบห่อ กรณีแครอทปรากฏความเสียหายจากเครื่องกล ความเสียหายจากศัตรูพืช รากที่ไม่สมบูรณ์หรือเป็นโรค และดินปนเปื้อน 3). แครอทต้องผ่านการเป่าด้วยความเย็นภายในโรงคัดบรรจุเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือยาวนานเพียงพอที่อุณหภูมิต่ำถึง 4 °C (39.2 °F) และต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C ความชื้นสัมพันธ์ ร้อยละ 90 การเคลื่อนไหวทางอากาศอย่างน้อย 19-23 cfm (ลูกบาศก์ฟุตต่อนาที) ต่อตันเมื่อเก็บแครอทจำนวนมาก

การจัดการก่อนส่งออก ได้แก่ 1). แครอทต้องถูกตรวจสอบจากประเทศต้นทาง และพบว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน สำหรับแมลงหรือไร เช่น การรมยาด้วยเมทิลโบร์ไมด์ที่ อัตรา 32 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียสที่ประเทศต้นทาง 2). ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช จากประเทศต้นทางซึ่งระบุข้อความเพิ่มเติม เพื่อรับรองว่า “แครอทมีการตรวจสอบ และพบว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน” 3). แครอทนำเข้ามาในราชอาณาจักรไทยในลักษณะเพื่อการค้าเท่านั้น

การจัดการเมื่อนำเข้า ได้แก่ 1). การตรวจเอกสารการนำเข้าตามเงื่อนไขการนำเข้าให้ถูกต้อง2) แครอทเข้ามาในราชอาณาจักรไทย จะต้องมีสุ่มตรวจลักษณะทั่วไปบนหัวแครอท และสุ่มตรวจในห้องปฏิบัติการ และพบว่าปลอดจากศัตรูพืชกักกัน กรณีตรวจพบศัตรูพืชที่ไม่ใช่ศัตรูพืชกักกัน ทำการกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวด้วยวิธีการที่เหมาะสม

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แครอท (carrot) เป็นพืชที่เจริญได้ดีในอากาศหนาว มีแหล่งผลิตปริมาณมากที่สุดในโลก คือ สาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาได้แก่ สหพันธรัฐรัสเซีย สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐโปแลนด์ และ สหราชอาณาจักร ตามลำดับ สำหรับประเทศไทยมีการนำเข้าแครอทในปี 2550 ปริมาณมากที่สุดคือสาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาได้แก่ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ จากผลการตรวจสอบศัตรูพืชบนแครอทนำเข้าจากต่างประเทศ ณ ด่านตรวจพืชลาดกระบังและท่าเรือกรุงเทพฯ ระหว่างเดือน เมษายน 2551- กุมภาพันธ์ 2552 รวม 3 ประเทศ 13 ตัวอย่าง ได้แก่ แครอทนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน พบเชื้อรา *Thielaviopsis thielavioides*, *Alternaria radicina., Rhizopus* sp.,*Geotichum* sp., *Ulocladium* sp. ออสเตรเลีย พบเชื้อรา *Thielaviopsis thielavioides* และ *Fusarium solani* และนิวซีแลนด์ 3 ตัวอย่าง พบเชื้อรา *Phoma* sp. และผลการศึกษาวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับการนำเข้าแครอท พบว่าศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงปานกลาง มีจำนวน 25 ชนิด ได้แก่ แมลง *Psila rosae, Napomyza carotae, Naupactus leucoloma*, *Listronotus oregonensis, Listronotus texanus* ไร *Halotydeus destructor*

ไส้เดือนฝอย *Meloidogyne chitwoodi*, *Meloidogyne fallax*, *Meloidogyne ethiopica, Ditylenchus destructor, Nacobbus aberrans, Heterodera schachtii*, *Heterodera carotae,* แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv.*carotae*, *Pseudomonas marginalis* pv.*marginalis, Pseudomonas viridiflava* เชื้อรา *Chalara elegans, Phymatotrichopsis omnivore, Mycocentrospora acerina*, *Pythium sulcatum, Pythium violae, Phytophthora megasperma*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora medicaginis, Fusarium culmorum* ซึ่งจำเป็นต้องมีมาตรการสุขอนามัยพืชเพื่อลดความเสี่ยง สำหรับมาตรการควบคุมการนำเข้าแครอท ปัจจุบันอาศัยอำนาจตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้แครอทจากทุกแหล่งทั่วโลก จัดเป็นพืชสิ่งกำกัด การนำเข้าต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชกำกับมาด้วย ตลอดจนมาตรการจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของศัตรูพืชที่มีรายงานการในประเทศผู้ส่งออก ซึ่งมาตรการดำเนินการอาจใช้วิธีเดียวหรือหลายๆ วิธีมาปฏิบัติร่วมกัน เช่น การจัดการในแหล่งผลิต การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว และการจัดการก่อนการส่งออก หรือ ณ จุดนำเข้า เพื่อลดความเสี่ยงศัตรูพืชกักกันลงมาในระดับที่ยอมรับได้

เอกสารอ้างอิง

นิพนธ์ ไชยมงคล. 2545. แครอท. (http://www.agric-prod.mju.ac.th/vegetable/File_link/carrot.pdf)

สำนักควบคุมพืช และวัสดุการเกษตร. 2550. สถิติการนำเข้าแครอทจากต่างประเทศ. สำนักควบคุมพืช และวัสดุการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตร และสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

Anonymous. 2004. Pest Risk Analysis for Quarantine Pests Including Analysis of Environmental Risks Pest risk Analysis for Quarantine Pests. ISPM No. 11, FAO, Rome.

CAB International. 2007.Crop Protection Compendium 2007 Edition.(Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Davis, E.E and R. C. Venette. 2004. Mini Risk Assessment : False Columbia Root –knot Nematode, *Meloidogyne fallax* Karssen (Nematoda: Heteroderidae). Department of Entomology, University of Minnesota. 30 pp.

Lakin, K. 2005. A Qualitative, Pathway-Initiated Risk Assessemnt: Importation of Baby Carrot, *Daucus carota* L. ssp. *sativus*, from Zambia into the Continental United

States. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. Raleigh, NC. 20 pp.

Ministry of Agriculture (MOA). 2005. A Qualitative, Pathway-Initiated Risk Assessemnt: Importation of Carrots (*Daucus carota*) from Costa Rica into Jamaica. Plant Quarantine, Produce Inspection Unit, JamaiKa. 7 pp.

Porsche, S. 2006. Final Rule for Baby Corn and Baby Carrot from Zambia. United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. Rivrdale, MD. 13 pp.

United States Department of Agriculture (USDA). 2000. Guideline for pathway-initiated pest risk assessments Version 5.02. Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine Permits and Risk Assessment, Commodity Risk Analysis Branch.

United States Department of Agriculture (USDA). 2004. Fresh fruits and vegetables manual.http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/ports/downloads/fv.pdf)

United States Department of Agriculture (USDA). 2005. Carrots: U.S. import-eligible countries; world production and exports. http://www.ers.usda.gov/Data/fruitvegphyto/Data/veg-carrot.xls

United States Department of Agriculture (USDA). 2007. A Qualitative, Pathway-Initiated Risk Assessemnt: Importation of Peeled Baby Carrot, *Daucus carota* L. ssp. *sativus*, from Kenya into the Continental United States. Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. Raleigh, NC. 28 pp.

United States Department of Agriculture (USDA). 2007. Determination by the Administrator: Condition for Importation into the Continental United States of Peeled Baby Carrot, *Daucus carota* L. ssp. *sativus*, from the Republic of Kenya. Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. Riverdale, MD. 1 p.

United States Department of Agriculture (USDA). 2007. Factors Affecting Carrot Consumption in the United States. Outlook Report No. (VGS-31901) 21 pp. http://www.ers.usda.gov/publications/vgs/2007/03Mar/VGS31901/VGS31901.pdf

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งนำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Pest Risk Analysis for the Importation of Edible Rape Seeds

นงพร มาอยู่ดี[1/] ชลธิชา รักใคร่ [1/] เพ็ญศรี นันทสมสราญ[2/] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[3/]

[1/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[3/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของผักกาดกวางตุ้ง ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ผักกาดกวางตุ้ง (Edible Rape : *Brassica Chinensis* L.) เป็นพืชวงศ์ Brassicaceae ได้สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากทั่วโลก พบศัตรูพืชทั้งหมด จำนวน 31 ชนิด เป็นแมลง 18 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด วัชพืช 3 ชนิด ผลการตรวจเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่นำเข้าพบวัชพืช 9 ชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงแล้ว การประเมินศักยภาพของศัตรูพืชที่มีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ด ตั้งรกราก แพร่ระบาด และโอกาสทำความเสียหายทางเศรษฐกิจในประเทศไทย พบวัชพืชที่มี ความเสี่ยงสูงเป็นวัชพืชกักกัน จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Chenopodium album, Cirsium arvense, Polygonum aviculare Rumex acetosella* และ *Phalaris minor* ดังนั้นมาตรการจัดความเสี่ยงวัชพืชดังกล่าว สำหรับเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่นำเข้าและภาชนะที่บรรจุจะต้องสะอาด ในพื้นที่ปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ และบริเวณใกล้เคียงต้องไม่มีวัชพืชทั้ง 5 ชนิด ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทุกครั้งจะต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช ระบุว่าปราศจากวัชพืชกักกันจากประเทศต้นทางกำกับมาด้วย เมื่อมาถึงด่านตรวจพืชที่นำเข้า ต้องแจ้งให้พนักงานเจ้าหน้าที่ตรวจพืชสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ เพื่อตรวจสอบวัชพืช ถ้าหากตรวจพบวัชพืชกักกันจะไม่อนุญาตให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์ล็อตนั้น โดยส่งกลับประเทศต้นทางและ/หรือเผาทำลาย

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-02-01-51

คำนำ

ปัจจุบันทุกประเทศที่เป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) ให้การยอมรับในความตกลงการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) ซึ่งอยู่บนพื้นฐานและสามารถพิสูจน์ได้โดยทางวิทยาศาสตร์สำหรับการค้าระหว่างประเทศ เช่น กรณีการส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศผู้ส่งออกจะต้องส่งรายชื่อและข้อมูลศัตรูพืชของพืชส่งออกตามความต้องการของประเทศผู้นำเข้า เพื่อทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนที่จะอนุญาตให้สินค้าเกษตรนั้นๆเข้าประเทศ หรือกรณีการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศผู้นำเข้าจะดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชโดยใช้ข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในประเทศประกอบการพิจารณา โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลศัตรูพืชของพืชนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อกำหนดมาตรการควบคุมการนำเข้า ซึ่งประเทศไทยถือเป็นหลักปฏิบัติเช่นกัน ดังนั้นในการนำเข้าสินค้าเกษตรจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาศัตรูพืชเพื่อทราบชนิดและรายละเอียดของศัตรูพืช พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 กำหนดให้ผลไม้ส่วนใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ดอกไม้หรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม เพียงแต่แจ้งการนำเข้าโดยไม่ต้องมีการขออนุญาตก่อนนำเข้าหรือมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชกำกับมา เมล็ดพันธุ์พืชผักและผลไม้ส่วนมากจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials) และบางชนิดที่จัดอยู่ในประเภทสิ่งกำกัด (Restricted materials) ซึ่งมีเพียงแค่ใบรับรองปลอดศัตรูพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาโดยไม่มีคำรับรองพิเศษเพิ่มเติมแต่อย่างใด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (pest risk analysis) ของพืชนำเข้า ตามความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Agreement:SPS) “ มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่องการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม” (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk) เพื่อให้ทราบว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกัน นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้าต่อไปหรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ต่อไป การศึกษาและวิเคราะห์ความเสี่ยงวัชพืชได้มีการศึกษาเมล็ดวัชพืชของ Popay *et al*. (2003) ได้ทำการศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงบนสับปะรดที่นำเข้าประเทศนิวซีแลนด์ พบเมล็ดวัชพืชติดปะปนไปกับหัวสับปะรด จำนวน 12 ชนิด ซึ่งจัดเป็นวัชพืชร้ายแรงในเขตร้อนและอบอุ่น บางชนิดเป็นวัชพืชร้ายแรงสามารถงอกและเจริญเติบโตในเขตภาคเหนือของนิวซีแลนด์ ได้แก่ *Chromolaena odorata, Brachiaria mutica, Paspalum conjugatum, Rhynchelytrum*

roseum and Ageratum conyzoides รายงานการตรวจเมล็ดพันธุ์พืชคลุมดิน 4 ชนิด ของประเทศมาเลเซียซึ่งนำเข้าจากประเทศไทย ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย พบเมล็ดวัชพืชติดปะปนกับเมล็ดพันธุ์พืชคลุมดินดังกล่าว จำนวน 33 ชนิด เมล็ดวัชพืชซึ่งพบมากที่สุดได้แก่ *Eleusine indica* และ *Cynodon dactylon* (Sastroutomo and Sigh, 1988) นอกจากนี้ Zakaria and Nair (1985) ได้รายงานการตรวจสอบเมล็ดพืชคลุมดิน ซึ่งนำเข้าประเทศมาเลเซียจากประเทศไทย ศรีลังกา อินเดีย และฟิลิปปินส์ พบเมล็ดวัชพืชติดปะปนไปกับเมล็ดพืชคลุมดิน จำนวน 36 ชนิด เมล็ดวัชพืชที่พบมากได้แก่ *Mimosa pudica, Crotalaria* sp. และ *Axonopus* spp. รายงานการแพร่ระบาดของวัชพืชร้ายแรงในต่างประเทศพบว่า *Polygonum convolvulus* เป็นวัชพืชร้ายแรงในไร่ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวฟ่าง และธัญพืชของประเทศ บัลแกเรีย อังกฤษ ฟินแลนด์ เยอรมัน อินเดีย อิหร่าน นิวซีแลนด์ ฯลฯ (Holm et al., 1977)รายงานการงอกของ *Thlaspi arvense* เป็นวัชพืชใบเลี้ยงคู่ฤดูเดียว สกุลกะหล่ำงอกได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 10-23°C ในที่มีแสงขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด หนึ่งต้นผลิตเมล็ดได้ 10,000 – 15,000 เมล็ด เมล็ดมีชีวิตอยู่ในดินได้นาน 6 ปี (Hafiger et al., 1988*) Rumex crispus* เป็นวัชพืชใบกว้างอายุหลายปี งอกได้ดีเมื่อได้รับแสงมากและอุณหภูมิที่รับ (20-30°C) ขยายพันธุ์โดยเมล็ด และการแตกรากหนึ่งต้นผลิตเมล็ดได้ปริมาณ 29,000-60,000 เมล็ด เมล็ดที่เก็บไว้นาน 50 ปี สามารถงอกได้ถึง 52% บางเมล็ดมีชีวิตอยู่ได้ถึง 80 ปี (Holm et al., 1977)

อุปกรณ์

1. เมล็ดพันธุ์ ผักกาดกวางตุ้ง
2. ถาดนับเมล็ดพันธุ์
3. ตาชั่ง
4. ปากคีบ
5. จานแก้ว
6. กล้องจุลทรรศน์ (Stereo microscope)
7. ซีดีรอม (CPC 2007)
8. ภาชนะเก็บตัวอย่างศัตรูพืช
9. หนังสือ และวรสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ
10. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม" (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk)
11. วัสดุและอุปกรณ์คอมพิวเตอร์สำหรับสืบค้นข้อมูล

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืช
2. รวบรวมข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับข้อมูลในประเทศ
3. เก็บตัวอย่างและตรวจสอบศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า ณ จุดที่มีการนำเข้า
4. สำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแหล่งปลูก
5. วิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชที่มีศักยภาพเป็นศัตรูพืชกักกัน
6. กำหนดมาตรการทางวิชาการ/ กฎหมาย เพื่อควบคุมการนำเข้า
7. สรุปผลและเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552 (2 ปี)

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และ ด่านตรวจพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้ง ผักกาดกวางตุ้ง (Edible rape : *Brassica chinensis* L.) เป็นพืชวงศ์ Brassicaceae อายุสั้นฤดูเดียว มีอายุการเก็บเกี่ยว 35–45 วัน ลำต้นตั้งตรงมีสีเขียว ใบเดี่ยวเรียบ ไม่ห่อตัว ขอบใบเป็นรอยฟันเลื่อยเล็กๆ โคนใบหยักเป็นคลื่นเล็กน้อย ปลายใบมน ก้านใบที่ติดกับลำต้นมีสีเขียวอ่อนเป็นร่องเรียวกลมขึ้นไปหาแผ่นใบ ก้านใบหนา สีขาวอมเขียว ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืชจากทั่วโลกพบศัตรูพืชทั้งหมด จำนวน 31 ชนิด เป็นแมลง 18 ชนิด เชื้อรา 5 ชนิด แบคทีเรีย 3 ชนิด ไวรัส 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด วัชพืช 3 ชนิด ผลการตรวจเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่นำเข้าจากต่างประเทศพบวัชพืช 9 ชนิด ได้แก่ *Chenopodium album, Cirsium arvcnse, Lepidium campestre, Phalaris minor, Polygonum aviculare, Polygonum persicaria Ploygonum lapathifolium, Rumex acetose lla และ Rumex crispus* เมื่อทำการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงแล้ว การประเมินศักยภาพของศัตรูพืชที่มีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ด การตั้งรกราก แพร่ระบาด และโอกาสทำความเสียหายทางเศรษฐกิจในประเทศไทย พบวัชพืชที่มีความเสี่ยงต่ำ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Polygonum persicaria, Rumex crispus* มีความเสี่ยงปานกลาง 2 ชนิด คือ *Lepidium campestre, Polygonum lapathifolium* มีความเสี่ยงสูง 5 ชนิด ได้แก่ *Chenopodium album, Cirsium arvense, Polygonum aviculare* และ *Rumex acetosella Phalaris minor* รายงานในต่างประเทศโดย Holm et al., 1977 รายงานว่า *Chenopodium album*

เป็นวัชพืชร้ายแรงในในแปลงปลูกผักของประเทศ นิวซีแลนด์ สหรัฐอเมริกา สเปน โปตุเกส นอร์เวย์ ญี่ปุ่น อินเดีย ฟินแลนด์ แคนาดา ไอร์แลนด์ และบัลแกเรีย *C. album* ต้นใหญ่ๆ สามารถผลิตเมล็ดได้ถึง 500,000 เมล็ด *Cirsium arvemse* เป็นวัชพืชร้ายแรงในแปลงปลูกผักของประเทศบัลแกเรีย นิวซีแลนด์ อิหร่าน และแปลงปลูกข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ และแปลงธัญพืช ของประเทศอังกฤษ ฟินแลนด์ เยอรมันนี อินเดีย สหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ ยูโกสลาเวีย และบัลแกเรีย *Polygonum aviculare* มีแหล่งแพร่ระบาดอยู่ในหลายประเทศ ได้แก่ อเจนตินา่ แคนาดา ชิลี สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส อิตาลี เนเธอร์แลนด์ สเปน ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ โปแลนด์ นอร์เวย์ ฟินแลนด์ เดนมาร์ก สวีเดน (Hafliger, T.J. 1988) *Rumcx acetosella* แพร่ระบาดอยู่ในประเทศ สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส เยอรมัน อิตาลี แคนาดา ชิลี โปแลนด์ นอร์เวย์ สเปน สวีเดน สวิสเซอร์แลนด์ ฮังการี เนเธอร์แลนด์ เปรู อินเดีย เม็กซิโก ฟินแลนด์ (Hafliger, T.J. 1988) *Phalaris minor* แพร่ระบาดในแหล่งปลูกพืชของประเทศบราซิล อาเจนตินา ชิลี อิตาลี ฝรั่งเศส ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ สาธารณรัฐประชาชนจีน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ เกาหลี สหรัฐอเมริกา แคนาดา เม็กซิโก โบลิเวีย เปรู โคลัมเบีย เวเนซูเอล่า (Hafliger, E. 1981) นอกจากนี้วัชพืชทั้ง 5 ชนิด ยังเป็นวัชพืชกักกัน ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติม โดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งห้ามนำเข้าจากทุกแหล่งทั่วโลก ดังนั้นมาตรการในการจัดการความเสี่ยงวัชพืชกักกันทั้ง 5 ชนิดมีดังนี้

1. เมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่นำเข้าจากต่างประเทศและภาชนะที่บรรจุจะต้องสะอาด
2. ในพื้นที่ปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งและบริเวณใกล้เคียงต้องไม่มีวัชพืชกักกันทั้ง 5 ชนิด
3. ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทุกครั้งต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช ระบุว่าปราศจากวัชพืชกักกันทั้ง 5 ชนิด จากประเทศต้นทางกำกับมาด้วย
4. ในการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว จะต้องนำเข้ามาทางด่านตรวจพืช และต้องแจ้งให้เจ้าหน้าที่กักกันพืชสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบวัชพืช ถ้าหากตรวจสอบพบวัชพืชกักกันจะไม่อนุญาตให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์ล็อตนั้น โดยส่งกลับประเทศต้นทางและ/หรือเผาทำลาย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบวัชพืชที่มีความเสี่ยงสูงเป็นวัชพืชกักกันจำนวน 5 ชนิด *ได้แก่ Chenopodium album, Cirsium arvense, Polygonum aviculare, Phalaris minor* และ *Rumex acetosella* มีความเสี่ยงปานกลาง 2 ชนิด คือ *Lepidium campestre, Polygonum lapathifolium* มีความเสี่ยงต่ำ 2 ชนิด คือ *Polygonum persicaria* และ *Rumex crispus* สำหรับมาตรการในการจัดการความเสี่ยงได้อาศัยพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 เพื่อป้องกันและสกัดกั้นมิให้วัชพืชกักกันจากต่างประเทศเข้ามาแพร่ระบาดในแหล่งปลูกพืชของประเทศไทยในอนาคต ดังนั้นได้กำหนดมาตรการทางด้านกักกันพืชโดยกำหนดให้เมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งที่นำเข้าจากต่างประเทศและภาชนะที่บรรจุต้องสะอาด ในพื้นที่ปลูก เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดกวางตุ้งและบริเวณใกล้เคียงต้องไม่มีวัชพืชกักกันทั้ง 5 ชนิด การนำเข้าเมล็ดพันธ์ทุกครั้งต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชระบุว่าปราศจากวัชพืชกักกัน ดังกล่าวจากประเทศต้นทางกำกับมาด้วย เมื่อเมล็ดพันธ์ที่นำเข้ามาถึงด่านตรวจพืชต้องแจ้งให้เจ้าหน้าที่กักกันพืชทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบวัชพืช ถ้าหากตรวจพบวัชพืชกักกันจะไม่อนุญาตให้นำเข้าเมล็ดพันธุ์นั้น โดยส่งกลับประเทศต้นทาง และ/หรือ เผาทำลาย

เอกสารอ้างอิง

1. จุมพล สาระนาค อรพรรณ วิเศษสังข์ และจักรพงษ์ เจิมศิริ. 2540. โรคผัก. คู่มือนักวิชาการภาคสนาม ฝ่ายวิเคราะห์และบริการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร.113 หน้า.

2. พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ซูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สหมิตรพริ้นติ้ง อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี. 285 หน้า.

3. สมบูรณ์ เจริญฤทธิ์. 2543. การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การประชุมสัมมนาเรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยง (Pest risk analysis) เพื่อการส่งออกและนำเข้าสินค้าเกษตร 26 กันยายน 2546 ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ. 5 หน้า.

4. Anonymous 1996. Guidelines for pest risk analysis. ISPM Pub. No. 2, FAO, Rome.

5. Anonymous 2003. Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks. ISPM Pub. No. 11 Rev. 1, FAO, Rome.

6. CABI. 2007. Crop Protection Compendium [CD-ROM]. CAB International. Wallingford, UK.

7. Hafliger, E. and H. Scholz 1981. Grass Weeds 2. Switzerland : Ciba Geigy Ltd., Basle. 137 pp.

8. Hafliger, T.J. 1988. Dicot Weeds 3. Switzerland : Ciba-Geigy Ltd., Basle. 335 pp.

9. Holm, G.L. L., D.L. Plucknett, J.V. Pancho and J.P. Herberger. 1977. The World's Worst Weeds, Distribution and Biology. Honolulu : The University Press of Hawaii. 609 pp.

10. Sastroutomo, S.S. 1988. Weed Intercepted from imported grass seeds to Malaysia. Proc. 2nd Tropical Weed Science Conference, Phukct, Thailand 6-10 December, 1988. pp. 159-166.

11. Zakaria, N. and J. Nair. 1985. Weed Seeds and other contaminants in cover crop seeds imported into Penninsular Malaysia and their Quarantine implication, J. Plant Protection Tropics, 2 (1) : 53-59.

ศึกษาชนิดของไรศัตรูพืชในหัวหอม และกระเทียมที่นำเข้าจากประเทศจีน

Study on Mites Pest on Imported Onion and Garlic from China

พลอยชมพู กรวิภาสเรือง มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ผลจากการจำแนกชนิดไรศัตรูพืชบนหัวหอมและกระเทียมที่นำเข้าจากประเทศจีนผ่านทางด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย ด่านตรวจศัตรูพืชมุกดาหาร ด่านตรวจศัตรูพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจศัตรูพืชลาดกระบัง ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2548-สิงหาคม 2552 พบไรรวมทั้งสิ้น 23 ชนิด 8 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 16 ชนิด 2 วงศ์ ไรตัวห้ำ 8 ชนิด 6 วงศ์ ไรที่พบบนกระเทียมเป็นไรศัตรูพืช 16 ชนิด 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Acaridae 15 ชนิดคือ *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze and Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparèdeม *Rhizoglyphus* sp, *Sancasania berlesei* (Michael), *Sancasania oudemansi* (Zachvatkin), *Sancasania* sp., *Sancasania mycophagus* (Mègnin), *Schwiebia* sp., *Suidasia pontifica* Oudemans,, *Thyreophagus gallgoi* (Portus &Gomez), *Tyrophagus communis* Fan&Zhang, ,*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), *Tyrophagus robertsonae* Lynch, *Tyrophagus* sp., *Tyrophagus similis* Volgin และ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดคือ *Aceria tulipae* (Keifer) ไรศัตรูธรรมชาติพบ 6 ชนิด 5 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Phytoseiidae 2 ชนิดคือ *Amblyseius tareensis* Schicha และ *Amblyseius* sp. วงศ์ Cheyletidae 1 ชนิดคือ *Cheyletus* sp. ที่เหลืออีก 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Ascidae Ameroseiidae และ Stigmaeidae ส่วนไรที่พบบนหัวหอมเป็นไรศัตรูพืช 6 ชนิด 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Acaridae จำนวน 5 ชนิด คือ*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze&Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparède, *Rhizoglyphus* sp. *Sancasania berlesei* (Michael), *S. oudemansi* (Zachvatkin), *Sancasania* sp. และ *Tyrophagus communis* Fan & Zhang และ วงศ์ Eriophyidae จำนวน 1 ชนิด ไรศัตรูธรรมชาติพบ 4 ชนิด 4 วงศ์ ได้แก่ *Cheyletus fortis* Oudemans วงศ์ Cheyletidae และอีก 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Ameroseiidae Ascidae และ Laelapidae

---

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-03-03-51

คำนำ

ปัจจุบันประเทศไทยเปิดการค้าเสรีกับต่างประเทศในหลาย ๆ ประเทศด้วยกันเช่น ประเทศจีน ประเทศออสเตรเลีย อินเดีย เปรู และมีแนวโน้มที่จะเปิดการค้าเสรีกับต่างประเทศเพิ่มขึ้นอีกหลายประเทศ เช่น ญี่ปุ่น นิวซีแลนด์ กลุ่มประเทศ EFTA เกาหลี (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2549) มูลค่าการนำเข้าสินค้าเกษตร โดยส่วนใหญ่จะเป็นพืชผักผลไม้เมืองหนาวที่นำเข้ามาจากประเทศจีนผ่านเข้ามาทางด่านตรวจศัตรูพืชในประเทศไทยเช่นด่านตรวจพืชเชียงแสน ด่านตรวจพืชสะเดา ด่านตรวจพืชท่าเรือคลองเตย โดยเฉพาะด่านตรวจพืชเชียงแสน จ. เชียงรายนับเป็นด่านหลักที่มีการนำเข้าสินค้าเกษตรจากประเทศจีน สำหรับปริมาณการนำเข้ากระเทียมสดตั้งแต่ เดือนมกราคม-ธันวาคม ปี พ.ศ. 2552 มีปริมาณการนำเข้า 40,556 ตัน คิดเป็นมูลค่า 307.8 ล้านบาท ปริมาณการนำเข้าหอมหัวใหญ่ตั้งแต่ เดือนมกราคม-ธันวาคมปีพ.ศ. 2552 มีปริมาณการนำเข้า 37,691 ตัน คิดเป็นมูลค่า 335.20 ล้านบาท ปริมาณการนำเข้าหอมแดงตั้งแต่เดือนมกราคม-ธันวาคมปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณการนำเข้า 390 ตัน คิดเป็นมูลค่า 4 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) การนำเข้าหัวหอมและกระเทียมปริมาณสูง มีความเสี่ยงที่จะติดศัตรูพืชร้ายแรงที่เป็นศัตรูพืชกักกันเข้ามากับสินค้า สร้างความเสียหายอย่างร้ายแรงให้กับการเกษตรของไทย โดยเฉพาะไรนับเป็นศัตรูที่มีความสำคัญ มีขนาดเล็กทำให้ยากแก่การสังเกตเห็น ซึ่งได้มีรายงานการพบไรศัตรูพืชจากกระเทียมที่นำเข้าจากประเทศจีนเข้าในประเทศนิวซีแลนด์ ไว้หลายชนิดด้วยกันได้แก่ *Rhizoglyphus setosus* Manson, *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze and Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparède, *Tyrophagus longior* (Gervais), *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) และ *Tetranychus urticae* Koch (Pearson , 2006A) และในพืช ya pear (*Pyrus bretshneidori*) ที่นำเข้าจากประเทศจีน มีรายงานพบไรศัตรูพืชด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ Byobia mite (*Bryobia rubrioculus*), European red mite (*Panonychus ulmi*) และ ไรสองจุด (*T. urticae*) (Pearson, 2006B) สำหรับการศึกษาอนุกรมวิธานไรศัตรู กระเทียม ในประเทศไทยทั้งในสภาพไร่และสภาพการเก็บรักษาไว้หลังการเก็บเกี่ยว Suthosanee *et. al* (1980) ได้จำแนกไรศัตรูกระเทียมที่พบในประเทศไทยไว้ 5 ชนิด คือ *Aceria tulipae* (Keifer), *Rhizoglyphus* sp., *Suidasia* sp., *Tyrophagus* sp. และ *Caloglyphus* sp. วัฒนา (2546) รายงานพบไรหลายชนิดด้วยกันในหอมและกระเทียมที่ประเทศไทยได้แก่ *T. putrescentiae, Sancasania berlesei* (Michael), *R. echinopus* และ *Histiostoma* sp. มานิตา และคณะ (2548) ได้รายงานว่า พบไรศัตรูพืชในกระเทียมและหอมหลายชนิดด้วยกันได้แก่ *Caloglyphus berlesei* (Michael), *Caloglyphus oudemansi* (Zachavatkin), *R. echinopus* , *Suidasia medanensis* Oudemans, *T. putrescentiae*, *R. echinopus* และ *A. tulipae* นอกจากนี้Fan และZhang ปี 2007 รายงานพบไรสกุลนี้ในประเทศ

ไทย 3 ชนิดคือ *Tyrophagus javensis* (Oudemans), *T. robertsonae* และ *T. communis* ในประเทศจีน พบไรในสกุลนี้ไว้ 5 ชนิดด้วยกันคือ *Tyrophagus tropicus* Robertson *Tyrophagus neiswanderi* Johnston&Bruce , *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), *Tyrophagus communis* Fan&Zhang และ *Tyrophagus similis* Volgin,

ดังนั้นการจำแนกชนิดไรศัตรูพืชที่ตรวจพบบนสินค้านำเข้าจากด่านตรวจพืชนี้นับว่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอ้างอิงถึงศัตรูพืชที่ติดเข้ามาภายในประเทศ อีกทั้งยังเป็นการป้องกันไม่ให้มีศัตรูพืชร้ายแรงติดเข้ามาทำความเสียหายให้กับพืชปลูกของประเทศไทย และเป็นจุดเริ่มต้นในการจัดทำรายชื่อชนิดของไรศัตรูพืชนำเข้าเพื่อนำไปใช้อ้างอิงในด่านตรวจพืชอื่น ๆ ที่มีการนำเข้าผลิตผลทางการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างไร : ได้แก่ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ กล่องพลาสติกพู่กันเบอร์ 0 ขวดดองตัวอย่างไร ขนาด 1 แดรม บรรจุแอลกอฮอล์ 70% พู่กัน กล่องพลาสติกรักษาความเย็นขนาด 68 ควอทซ์ แว่นขยาย (กำลังขยาย 20x) และกรวยแยกไร (Berlese Tullgren funnel)

2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน : ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ (stereomicroscope) , ตะเกียงแอลกอฮอล์ โคมไฟ พู่กันเบอร์ 0 เข็มเขี่ยปลายแหลม และปลายงอ สำลี ตู้อบ/เครื่องอุ่นสไลด์ ตั้งอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส แป้นหมุนสำหรับผนึกขอบสไลด์ น้ำยาผนึกขอบสไลด์

3. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการตรวจจำแนกชนิดของไร : ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และ key สำหรับใช้จำแนกชนิดของไรศัตรูในโรงเก็บ และไรตัวห้ำในวงศ์ต่าง ๆ

4. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเก็บตัวอย่างไร ได้แก่ ถุงกระดาษ ถุงพลาสติกใสขนาดต่าง ๆ แอลกอฮอล์ 95% และสารเคมีสำหรับดองตัวอย่าง

5. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการเตรียมตัวอย่างไร เพื่อการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธาน ได้แก่ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ ปากกาเขียนกระจก กระดาษบันทึก กล่องใส่สไลด์ สารเคมี สำหรับใช้เตรียมน้ำยาเมาท์สไลด์ สำลี น้ำยาสำหรับผนึกขอบสไลด์

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างไรศัตรูพืชจากหัวหอมและกระเทียมจากด่านตรวจพืชจากด่านตรวจพืชต่าง ๆ นำตัวอย่างใบพืชที่ได้ใส่ถุงกระดาษและห่อด้วยถุงพลาสติกอีกชั้นหนึ่งแล้วรัดปากถุงด้วยยาง บันทึกข้อมูลจากตัวอย่างไรที่เก็บได้ เช่น ชื่อพืช ชื่อผู้เก็บ สถานที่ วันที่เก็บ จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อรักษาไม่ให้ตัวอย่างเสื่อมสภาพเร็ว หากตัวอย่างพืชที่ได้สามารถเก็บรักษานาน เช่น หอมและกระเทียม ไม่ต้องแช่ในกล่องน้ำแข็งให้นำตัวอย่างใส่ถุงกระดาษพับปากถุง แล้วนำตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดกลับมาทำสไลด์ต่อที่ห้องปฏิบัติการ

2. นำตัวอย่างมาทำสไลด์ถาวร ด้วยน้ำยา Hoyer's solution ด้วยการหยดน้ำยา Hoyer's solution ลงบนสไลด์ ใช้พู่กันเขี่ยตัวไรวางลงบนน้ำยา จากนั้นกดตัวไรให้จมลงในน้ำยา จัดตัวไรให้อยู่ในสภาพที่เห็นส่วนต่าง ๆ ได้อย่างชัดเจน ด้วยเข็มเขี่ยขนาดเล็ก ปิดตัวอย่างด้วย แผ่นแก้วปิดสไลด์ (coverglass) นำสไลด์ไปอังบนตะเกียงแอลกอฮอล์พอร้อน เพื่อให้อวัยวะส่วนต่าง ๆ ของไรยืดออกเต็มที่ และเพื่อไล่ฟองอากาศ เขียนหมายเลขรหัสของตัวอย่างที่ทำเสร็จเรียบร้อยลงบนสไลด์ บันทึกรายละเอียดที่สำคัญของตัวไรลงบนสมุดบันทึก จากนั้น นำตัวอย่างที่ทำเสร็จแล้วเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน จากนั้นนำสไลด์ที่ได้มาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 สัปดาห์ จึงผนึกขอบสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บ

3.นำสไลด์ถาวรที่เสร็จเรียบร้อยแล้วมาจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope ปิดป้ายบันทึกรายละเอียดเกี่ยวกับสถานที่ วันที่ที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บ และชื่อพืชไว้ด้านซ้ายของแผ่นสไลด์ ส่วน ชื่อวิทยาศาสตร์ไรที่จำแนกได้ไว้ด้านขวาของสไลด์

4. นำสไลด์เก็บในกล่องเก็บสไลด์และเรียงในพิพิธภัณฑ์ตามระบบสากลต่อไป

เวลาและสถานที่

ทำการศึกษาระหว่างเดือน กรกฎาคม 2548- สิงหาคม 2552 โดยการเก็บตัวอย่างหัวหอมและกระเทียมนำเข้าจากด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย ด่านตรวจพืชมุกดาหาร จังหวัดมุกดาหาร ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง ด่านตรวจพืชแม่สอด จังหวัดตาก ด่านตรวจพืชท่าเรือแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี และ ด่านตรวจพืชสะเดา จังหวัดสงขลา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างไรศัตรูพืชบนหัวหอมและกระเทียมที่นำเข้าจากประเทศจีนผ่านทางด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย ด่านตรวจศัตรูพืชมุกดาหาร จังหวัดมุกดาหาร ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพ ด่านตรวจพืชลาดกระบัง ตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2548-สิงหาคม 2552 พบไรรวมทั้งสิ้น 23 ชนิด 8 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 16 ชนิด 2 วงศ์ ไรตัวห้ำ 8 ชนิด 6 วงศ์ ไรที่พบบนกระเทียมเป็นไรศัตรูพืช 16 ชนิด 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Acaridae 15 ชนิดคือ *Rhizoglyphus echinopus*

(Fumouze and Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparède, *Rhizoglyphus* sp, *Sancasania berlesei* (Michael), *Sancasania oudemansi* (Zachvatkin), *Sancasania* sp., *Sancasania mycophagus* (Mègnin), *Schwiebia* sp., *Suidasia pontifica* Oudemans,, *Thyreophagus gallgoi* (Portus &Gomez), *Tyrophagus communis* Fan&Zhang, ,*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), *Tyrophagus robertsonae* Lynch, *Tyrophagus* sp., *Tyrophagus similis* Volgin และ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดคือ *Aceria tulipae* (Keifer) เป็นไรตัวห้ำ 6 ชนิด 5 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Phytoseiidae 2 ชนิดคือ *Amblyseius tareensis* Schicha และ *Amblyseius* sp. วงศ์ Cheyletidae 1 ชนิดคือ *Cheyletus* sp. ที่เหลืออีก 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Ascidae Ameroseiidae และ Stigmaeidae Table 1 และ 2 จากผลการสำรวจและจำแนกชนิดไรที่พบในกระเทียมนำเข้าจากประเทศจีน พบไรศัตรูพืช 2 ชนิด ที่เป็นศัตรูพืชกักกันตามพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 คือ *Tyrophagus similis* Volgin และ *Sancasania mycophagus* (Mègnin) ชื่อสกุลเดิมคือ *Caloglyphus* จากด่านตรวจศัตรูพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย

ส่วนไรที่พบบนหัวหอมเป็นไรศัตรูพืช 6 ชนิด 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Acaridae จำนวน 5 ชนิด คือ*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze & Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparède, *Rhizoglyphus* sp. *Sancassania berlesei* (Michael), *S. oudemansi* (Zachvatkin), *Sancasania* sp. และ *Tyrophagus communis* Fan & Zhang และวงศ์ Eriophyidae จำนวน 1 ชนิด ไรศัตรูธรรมชาติพบ 4 ชนิด 4วงศ์ ได้แก่ *Cheyletus fortis* Oudemans วงศ์ Cheyletidae และอีก 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Ameroseiidae Ascidae และ Laelapidae Table 3 และ 4 ไม่พบไรศัตรูพืชกักกันในหัวหอมนำเข้าดังกล่าว สำหรับด่านตรวจศัตรูพืชอื่น ๆ มีการนำเข้าหัวหอมและกระเทียมจากประเทศอื่น ๆ เช่นด่านตรวจศัตรูพืชแม่สอด จังหวัดตาก ส่วนใหญ่นำเข้าหัวหอมและกระเทียมจากประเทศพม่าพบไรศัตรูบนหัวหอมนำเข้า 6 ชนิด 3 วงศ์ ไรศัตรูธรรมชาติ 2 ชนิด 2 วงศ์ ด่านตรวจศัตรูพืชสะเดา จังหวัดสงขลา นำเข้าหัวหอมและกระเทียมจากประเทศอินโดนีเซีย พบไรศัตรูบนหัวหอมนำเข้า 1 ชนิด 1 วงศ์ ไรศัตรูธรรมชาติ 1 ชนิด 1 วงศ์ Appendix 1 และ 2 สำหรับด่านตรวจพืชแหลมฉบังไม่พบไรศัตรูพืช จึงไม่ได้รายงานไว้ในตารางแสดงผล การเก็บตัวอย่างไรศัตรูบนหัวหอมและกระเทียม มักประสบปัญหาจากตัวอย่างที่ส่งมาจำแนกที่ดองในแอลกอฮอล์นานเกินไปทำให้ตัวอย่างแข็ง ไม่สามารถจะจัดท่าทางที่เหมาะสมกับการจำแนกได้ นอกจากนี้ปัญหาที่พบก็คือคู่มือการจำแนกที่เก่าและไม่ทันสมัย จึงได้จำนวนชนิดไรที่มีความหลากหลายน้อย ซึ่งปัจจุบัน กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม ได้รับคู่มือการจำแนกมาใหม่ โดยคู่มือการจำแนกนี้เป็น ของ Fan และ Zhang ปี 2007 ทำให้การจำแนกชนิดของไรมีการเปลี่ยนแปลงโดยไรในสกุล *Tyrophagus* ที่พบในประเทศไทยทั้งหมดจากพิพิธภัณฑ์ของกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กรมวิชาการเกษตร จากเดิมที่จำแนกเป็น *T. putrescentiae* ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนชื่อ มาเป็น *T.*

communis โดยใช้ลักษณะการจำแนกที่ละเอียดเพิ่มขึ้นคือ ใช้ลักษณะความยาวของขนด้านสันหลัง ลักษณะรูปร่างของท่อ spermatheca ในเพศเมีย ลักษณะจุดประ (eyespots) บนแผ่นแข็งด้านสันหลัง (prodorsal shield) รูปร่างของแผ่นแข็งบริเวณฐานของ coxa II รูปร่างลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และลักษณะอื่นๆ อีกหลายลักษณะ ซึ่งคู่มือการจำแนกชนิดเล่มเดิมของ Hughes, 1976 ซึ่งใช้เพียงขนาดความยาวของขนด้านสันหลัง และลักษณะของขน Supracoxal seta และ ขน Solenidion w_1 ลักษณะรูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลจากการจำแนกชนิดไรบนหัวหอมและกระเทียมที่นำเข้าจากประเทศจีนผ่านทางด่านตรวจพืชต่าง ๆ พบไรรวมทั้งสิ้น 23 ชนิด 8 วงศ์ เป็นไรศัตรูพืช 16 ชนิด 2 วงศ์ ไรตัวห้ำ 8 ชนิด 6 วงศ์ ไรที่พบบนกระเทียมเป็นไรศัตรูพืช 16 ชนิด 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Acaridae 15 ชนิดคือ *Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze and Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparède, *Rhizoglyphus* sp, *Sancassania berlesei* (Michael), *Sancasania oudemansi* (Zachvatkin), *Sancasania* sp., *Sancasania mycophagus* (Mègnin), *Schwiebia* sp., *Suidasia pontifica* Oudemans,, *Thyreophagus gallgoi* (Portus &Gomez), *Tyrophagus communis* Fan&Zhang, ,*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), *Tyrophagus robertsonae* Lynch, *Tyrophagus* sp., *Tyrophagus similis* Volgin และ วงศ์ Eriophyidae 1 ชนิดคือ *Aceria tulipae* (Keifer) เป็นไรตัวห้ำ 6 ชนิด 5 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Phytoseiidae 2 ชนิดคือ *Amblyseius tareensis* Schicha และ *Amblyseius* sp. วงศ์ Cheyletidae 1 ชนิดคือ *Cheyletus* sp. ที่เหลืออีก 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Ascidae Ameroseiidae และ Stigmaeidae ส่วนไรที่พบบนหัวหอมเป็นไรศัตรูพืช 6 ชนิด 2 วงศ์ ได้แก่ วงศ์ Acaridae จำนวน 5 ชนิด คือ*Rhizoglyphus echinopus* (Fumouze & Robin), *Rhizoglyphus robini* Claparède, *Rhizoglyphus* sp. *Sancasania berlesei* (Michael), *S. oudemansi* (Zachvatkin), *Sancasania* sp. และ *Tyrophagus communis* Fan & Zhang และ วงศ์ Eriophyidae จำนวน 1 ชนิด ไรศัตรูธรรมชาติพบ 4 ชนิด 4 วงศ์ ได้แก่ *Cheyletus fortis* Oudemans วงศ์ Cheyletidae และอีก 3 ชนิดอยู่ในวงศ์ Ameroseiidae Ascidae และ Laelapidae

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr. Zhi-Qiang Zhang จากประเทศนิวซีแลนด์ ที่ช่วยจำแนกชนิดของไรยืนยันชื่อชนิดของไร และกรุณาให้หนังสือคู่มือการจำแนกชนิดไรจำนวนหลายเล่ม แก่กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม ขอขอบคุณคุณกอบกุล วิภาวสุ และหัวหน้าด่านตรวจพืชเชียงแสน จังหวัดเชียงราย คุณอมรศักดิ์ จู้ทิน และหัวหน้าด่านตรวจพืชสะเดา จังหวัดสงขลา หัวหน้าด่านท่าเรือกรุงเทพ

หัวหน้าด่านตรวจศัตรูพืชลาดกระบัง คุณสฤษดิ์ ฟุ้งสุข และหัวหน้าด่านตรวจพืชมุกดาหาร จังหวัดมุกดาหาร ขอขอบคุณ คุณสุทัศน์ แก้วสะอาด คุณอรุณศรี อุ่ยวิรัตน์ ด่านตรวจศัตรูพืชแหลมฉบัง คุณวราลักษณ์ กลิ่นใหญ่ และหัวหน้าด่านตรวจพืชแม่สอด จังหวัดตาก ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างไรจากหัวหอมและกระเทียมเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. 2549. ความคืบหน้า/สถานะการเจรจา. [Online].Available:http://www.thaifta.com/ThaiFTA/HOME/NegoLastestStatus/tabid/117 /Default. aspx [2006, May 17]

วัฒนา จารณศรี. 2546. การศึกษาอนุกรมวิธานของไรบนพืชสมุนไพร. น. 802-810 *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2546 ครั้งที่ 2. สำนักวิจัยและพัฒนาอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

มานิตา คงชื่นสิน พลอยชมพู กรวิภาสเรือง เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2548. การศึกษาไรศัตรูพืชเพื่อการนำเข้า. น. 440-464. ใน รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548 เล่ม 1. กลุ่มกีฏและสัตวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. สถิติการนำเข้า. http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php

Hughes, A. M. 1976. The mites of stored food and houses. Her Majesty's Stationery office. London. 400 p.

Fan, Q-H. and Z-Q. Zhang. 2007. Tyrophagus (Acari: Astigmata: Acaridae). Lincoln, Canterbury, New Zealand. 291 p.

Pearson, D. (A). 2006. Import Health Standard Commodity Sub-class: Fresh fruit/ vegetables Garlic Allium sativum from the people's Republic of China [Online]. Available: http://www.Biosecurity.govt.nz/imports/plants/standards/garlicpro.pdf.[2006,Febr uary 20]

Pearson, D. (B). 2006. Import Health Standard Commodity Sub-class: Fresh fruit/vegetables Ya pear, *Pyrus brestshneideri* from the people's Republic of China [Online]. Available: http://www.biosecurity.govt.nz/files/sps/transparency/notifications/nz 1340-ft.pdf. [2006,February 10]

Suthasanee, B, C. Lekprayoon and W. Meckvichai. 1980. Insects and Mite found on Stored garlic in Thailand Natural History Bulletin of the Siam society. Vol 34(2): 105-113.

Table 1. Mite pests found on imported garlic from China intercepted at Plant Quarantine Station,Thailand (July, 2005-July, 2008)

Scientific name of mite	Part of plants infected by mite pests	Location	Remark
Family Acaridae			
Rhizoglyphus echinopus (Fumouze & Robin)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Rhizoglyphus robini Claparède	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Rhizoglyphus sp.	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Sancasania berlesei (Michael)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station Mukdahan Plant Quarantine Station	
Sancasania oudemansi (Zachvatkin)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station Mukdahan Plant Quarantine Station	
Sancasania mycophagus (Mègnin)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	Confirm by Dr. Zhi-Qiang Zhang
Sancasania sp.	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station Mukdahan Plant Quarantine Station	

Table 1. (Continous) Mite pests found on imported garlic from China intercepted at Plant Quarantine Station,Thailand (July, 2005-July, 2008))

Scientific name of mite	Part of plants infected by mite pests	Location	Remark
Schwiebia sp.	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Suidasia pontifica Oudemans	bulb	Mukdahan Plant Quarantine Station	
Thyreophagus gallgoi (Portus &Gomez)		Mukdahan Plant Quarantine Station	Indentify by Dr.Zhi-Qiang Zhang
Tyrophagus communis Fan & Zhang	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
		Mukdahan Plant Quarantine Station	
Tyrophagus putrescentiae (Schrank)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Tyrophagus robertsonae Lynch	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Tyrophagus sp.		Chiangsan Plant Quarantine Station	
		Mukdahan Plant Quarantine Station	
Tyrophagus similis Volgin	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	Confirm by Dr. Zhi-Qiang Zhang
Family Eriophyidae *Aceria tulipae* (Keifer)	bulb	Mukdahan Plant Quarantine Station	

Table 2. Predatory mite found on imported garlic from China intercepted at Plant Quarantine Station, Thailand (July, 2005-July, 2008)

Scientific name of mite	Location	Remark
Family Ascidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
	Mukdahan Plant Quarantine Station	
Family Ameroseiidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
	Mukdahan Plant Quarantine Station	
Family Cheyletidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Cheyletus sp.	Mukdahan Plant Quarantine Station	
Family Phytoseiidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Amblyseius tareensis Schicha		
Amblyseius sp.		
Family Stigmaeidae	Mukdahan Plant Quarantine Station	

Table 3. Mite pests found on imported Shallot and Onion from China intercepted at Plant Quarantine Station, Thailand (July, 2005-August, 22009)

Scientific name of mite	Part of plants infected by mite pests	Location	Remark
Family Acaridae			
Rhizoglyphus echinopus (Fumouze and Robin)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Rhizoglyphus robini Claparède	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Rhizoglyphus sp.	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Sancasania berlesei (Michael)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
		Latkrabang Plant Quarantine Station	
Sancasania oudemansi (Zachvatkin)	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
		Port of Bangkok Plant Quarantine Station	
Sancasania sp.	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Tyrophagus communis Fan and Zhang	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	
		Latkrabang Plant Quarantine Station	
Family Eriophyidae	bulb	Chiangsan Plant Quarantine Station	

Table 4. Predatory mite were found on imported Shallot and Onion from China intercepted at Plant Quarantine Station,Thailand (July, 2005-August, 2009)

Scientific name of mite	Location	Remark
Family Ascidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Family Ameroseiidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Family Cheyletidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	
Cheyletus fortis Oudemans		
Family Laelapidae	Chiangsan Plant Quarantine Station	

ภาคผนวก

APPENDIX1 : Mite pests found on imported Onion from Indonesia and Myanma intercepted at Plant Quarantine Station, Thailand (July, 2005-July, 2008)

Scientific name of mite	Part of plants infected by mite pests	Location	Remark
Family Acaridae			
Sancasania berlesei (Michael)	bulb	Maesod Plant Quarantine Station	Imported from Myanma
Sancasania oudemansi (Zachvatkin)	bulb	Sadoa Plant Quarantine Station	Imported from Indonesia
Sancasania sp.	bulb	Maesod Plant Quarantine Station	Imported from Myanma
Tyrophagus communis Fan& Zhang	bulb	Maesod Plant Quarantine Station	Imported from Myanma
Tyrophagus sp.	bulb	Maesod Plant Quarantine Station	Imported from Myanma
Family Eriophyidae *Aceria tulipae* (Keifer)	bulb	Maesod Plant Quarantine Station	Imported from Myanma
Family Histiostomidae	bulb	Maesod Plant Quarantine Station	Imported from Myanma

APPENDIX2 : Predatory mite found on imported Onion from Indonesia and Myanma intercepted at Plant Quarantine Station,Thailand (July, 2005-July, 2008)

Scientific name of mite	Location	Remark
Family Ascidae	MaeSod Plant Quarantine Station	
Family Cheyletidae	Sadoa Plant Quarantine Station MaeSod Plant Quarantine Station	

การศึกษาชนิดของศัตรูพืชที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Quarantine pest of Imported Tomato Seeds

ชลธิชา รักใคร่ ศรีวิเศษ เกษสังข์ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์ วันเพ็ญ ศรีชาติ ปริเชษฐ์ ตั้งกาจนภาสน์ วานิช คำพานิช
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) มีศัตรูพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 428 ชนิด เป็นแมลง 192 ชนิด ไร 4 ชนิด ไวรัส 49 ชนิด ไวรอยด์ 2 ชนิด แบคทีเรีย 26 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด รา 97 ชนิด ไส้เดือนฝอย 49 ชนิด และวัชพืช 52 ชนิด ในจำนวนนี้มีศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกักพืชหลายชนิด มีศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง (High risk) 30 ชนิด และได้สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของมะเขือเทศที่มีรายงานการนำเข้ามาในประเทศระหว่างปีพ.ศ. 2551-2552 จำนวน 14 ประเทศ เช่น ประเทศ สหรัฐอเมริกา อินเดีย เนเธอร์แลนด์ ไต้หวัน สเปน จีน ญี่ปุ่น เกาหลี อินโดนีเซีย อิตาลี ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืช พบว่า มีศัตรูพืชทั้งหมด 162 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันจำนวน 32 ชนิด ได้ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างที่จุดนำเข้าที่ด่านตรวจพืชได้จำนวน 182 ตัวอย่าง ผลการตรวจจำแนกพบชนิดพบเชื้อโรคศัตรูพืชได้แก่ *Furarium moniliform, Fusarium oxysporum ,Fusarium solani,Curvularia pallescens,Cladosporium sp. ,Alternaria tenuis ,Drechslera hawaiensis* ประเทศที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุดได้แก่ สหรัฐอเมริกา ,จีน ,อิตาลี ,อินโดนีเซีย และเนเธอร์แลนด์ ประเทศที่ตรวจไม่พบเชื้อเช่น Israel,Islands,Japan สำหรับผลการติดตามตรวจสอบเชื้อโรคศัตรูพืชในแปลงผลิตของเกษตรกรภายหลังการนำเข้า แล้วนำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการผลการตรวจไม่พบศัตรูพืชกักกัน

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-03-04-51

คำนำ

ปัจจุบันทุกประเทศที่เป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) ให้การยอมรับในความตกลงการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) ซึ่งอยู่บนพื้นฐานและสามารถพิสูจน์ได้โดยทางวิทยาศาสตร์สำหรับการค้าระหว่างประเทศ เช่น กรณีการส่งออกสินค้าเกษตร ประเทศผู้ส่งออกจะต้องส่งรายชื่อและข้อมูลศัตรูพืชของพืชส่งออกตามความต้องการของประเทศผู้นำเข้า เพื่อทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชก่อนที่จะอนุญาตให้สินค้าเกษตรนั้นๆเข้าประเทศ หรือกรณีการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศผู้นำเข้าจะดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชโดยใช้ข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในประเทศประกอบการพิจารณา โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลศัตรูพืชของพืชนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อกำหนดมาตรการควบคุมการนำเข้า ซึ่งประเทศไทยถือเป็นหลักปฏิบัติเช่นกัน ดังนั้นในการนำเข้าสินค้าเกษตรจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาศัตรูพืชเพื่อทราบชนิดและรายละเอียดของศัตรูพืช

พระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 กำหนดให้ผลไม้ส่วนใหญ่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ เมล็ดพันธุ์พืชผักต่าง ๆ ดอกไม้หรือไม้ประดับหลายชนิดจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม เพียงแต่แจ้งการนำเข้าโดยไม่ต้องมีการขออนุญาตก่อนนำเข้า หรือมีใบรับรองปลอดศัตรูพืชกำกับมา เมล็ดพันธุ์พืชผักและผลไม้ส่วนมากจัดเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม (unprohibited materials) และบางชนิดที่จัดอยู่ในประเภทสิ่งกำกัด (Restricted materials) ซึ่งมีเพียงใบรับรองปลอดศัตรูพืชจากประเทศต้นทางกำกับมาโดยไม่มีคำรับรองพิเศษเพิ่มเติมแต่อย่างใด จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่**จะต้องดำเนินการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (pest risk analysis)** ของพืชนำเข้า ตามความตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช(Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Agreement:SPS) “ มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม” (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk) เพื่อให้ทราบว่ามีศัตรูพืชชนิดใดบ้างเป็นศัตรูพืชกักกัน นำมาพิจารณาหามาตรการเพื่อจัดการความเสี่ยงศัตรูพืชชนิดนั้น ๆ และกำหนดเป็นมาตรการทางด้านกฎหมายและทางวิชาการในการควบคุมการนำเข้าต่อไป หรือเปลี่ยนแปลงสถานภาพของพืชนำเข้าให้เป็นสิ่งต้องห้ามหรือสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืชพ.ศ. 2507

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ
2. กล้องจุลทรรศน์ (Stereo microscope)

3. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
4. สารเคมีตรวจสอบเชื้อโรคพืช
5. ภาชนะเก็บตัวอย่างพืช
6. ชุดตรวจสอบศัตรูพืช (ELISA Kit)
7. หนังสือ และวรสารทั้งในประเทศและต่างประเทศ
8. มาตรฐานนานาชาติสำหรับมาตรการสุขอนามัยพืช ฉบับที่ 11 เรื่อง การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับศัตรูพืชกักกันรวมทั้งการวิเคราะห์ความเสี่ยงทางสภาพแวดล้อม" (ISPM No. 11 : Pest risk analysis for quarantine pest including analysis of environmental risk)

วิธีการ

1. รวบรวมข้อมูลทั่วไปของพืช
2. รวบรวมข้อมูลศัตรูพืชที่มีรายงานในต่างประเทศ เปรียบเทียบกับข้อมูลในประเทศ
3. เก็บตัวอย่างและตรวจสอบศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้า ณ จุดที่มีการนำเข้า
4. สำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชภายหลังการนำเข้าในแหล่งปลูก
5. รวบรวมชนิดของศัตรูพืชที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่ตรวจสอบได้
6. กำหนดมาตรการทางวิชาการ/ กฎหมาย เพื่อควบคุมการนำเข้า
7. สรุปผลและเขียนรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552 (2 ปี)
ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และ ด่านตรวจพืช

ผลและวิจารณ์การทดลอง

มะเขือเทศมีสิ่งมีชีวิตทั้งที่เป็นศัตรู/ไม่เป็นศัตรูของมะเขือเทศรวมทั้งสิ้นจำนวน 428 ชนิด เป็นแมลง 192 ชนิด ไร 4 ชนิด ไวรัส 49 ชนิด ไวรอยด์ 2 ชนิด แบคทีเรีย 26 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด รา 97 ชนิด ไส้เดือนฝอย 49 ชนิด และวัชพืช 52 ชนิด ในจำนวนนี้มีศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกักพืช ที่มีรายงานพบทำลายบนส่วนเมล็ดพันธ์ ของมะเขือเทศ จำนวน 60 ชนิด เป็นแมลง 13 ชนิด ไร 4 ชนิด ไวรัส 10 ชนิด ไวรอยด์ 2 ชนิด แบคทีเรีย 5 ชนิด และรา 6 ชนิด ไส้เดือนฝอย 1 ชนิด และวัชพืช 19 ชนิด ผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชกักกัน (Risk assessment) แต่ละชนิดในเบื้องต้น พบว่า มีศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง (High risk) 30 ชนิดและได้สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของ

มะเขือเทศที่มีรายงานการนำเข้ามาในประเทศระหว่างปีพ.ศ. 2551-2552 จำนวน 14 ประเทศ เช่น ประเทศ สหรัฐอเมริกา อินเดีย เนเธอร์แลนด์ ไต้หวัน สเปน จีน ญี่ปุ่น เกาหลี อินโดนีเซีย อิตาลี ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืช พบว่า มีศัตรูพืชทั้งหมด 162 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันจำนวน 32 ชนิด ได้ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างที่จุดนำเข้าที่ด่านตรวจพืชได้จำนวน 182 ตัวอย่าง ผลการตรวจจำแนกพบชนิดพบเชื้อโรคศัตรูพืชได้แก่ *Furarium moniliform, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Curvularia pallescens, Cladosporium sp.,Alternaria tenuis,Drechslera hawaiensis* ประเทศที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุดได้แก่ สหรัฐอเมริกา ,จีน ,อิตาลี ,อินโดนีเซีย และเนเธอร์แลนด์ ประเทศที่ตรวจไม่พบเชื้อเช่น Israel,Islands,Japan สำหรับผลการติดตามตรวจสอบเชื้อโรคศัตรูพืชในแปลงผลิตของเกษตรกรภายหลังการนำเข้า โดยสุ่มตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรจำนวน 126 ตัวอย่าง แล้วนำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการผลการตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคพืช จำนวน 52 ตัวอย่าง ดำเนินการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงแล้วพบว่าเป็นศัตรูพืชชนิดที่มีรายงานในประเทศไทยอยู่แล้ว ยังไม่พบศัตรูพืชกักกัน

สรุปผลการทดลอง

มะเขือเทศมีศัตรูพืชรวมทั้งสิ้นจำนวน 428 ชนิด เป็นแมลง 192 ชนิด ไร 4 ชนิด ไวรัส 49 ชนิด ไวรอยด์ 2 ชนิด แบคทีเรีย 26 ชนิด ไฟโตพลาสมา 2 ชนิด รา 97 ชนิด ไส้เดือนฝอย 49 ชนิด และวัชพืช 52 ชนิด ในจำนวนนี้มีศัตรูพืชที่สำคัญด้านกักกักพืชหลายชนิด มีศัตรูพืชกักกันที่มีความเสี่ยงสูง (High risk) 30 ชนิด และได้สืบค้นข้อมูลศัตรูพืชของมะเขือเทศที่มีรายงานการนำเข้ามาในประเทศระหว่างปีพ.ศ. 2551-2552 จำนวน 14 ประเทศ เช่น ประเทศ สหรัฐอเมริกา อินเดีย เนเธอร์แลนด์ ไต้หวัน สเปน จีน ญี่ปุ่น เกาหลี อินโดนีเซีย อิตาลี ผลการสืบค้นข้อมูลศัตรูพืช พบว่า มีศัตรูพืชทั้งหมด 162 ชนิด เป็นศัตรูพืชกักกันจำนวน 32 ชนิด ได้ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างที่จุดนำเข้าที่ด่านตรวจพืชได้จำนวน 182 ตัวอย่าง ผลการตรวจจำแนกพบชนิดพบเชื้อโรคศัตรูพืชได้แก่ *Furarium moniliform, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Curvularia pallescens, Cladosporium sp., Alternaria tenuis ,Drechslera hawaiensis*ประเทศที่ตรวจพบเชื้อมากที่สุดได้แก่ สหรัฐอเมริกา ,จีน ,อิตาลี ,อินโดนีเซีย และเนเธอร์แลนด์ ประเทศที่ตรวจไม่พบเชื้อเช่น Israel,Islands,Japan สำหรับผลการติดตามตรวจสอบเชื้อโรคศัตรูพืชในแปลงผลิตของเกษตรกรภายหลังการนำเข้า แล้วนำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการผลการตรวจไม่พบศัตรูพืชกักกัน

เอกสารอ้างอิง

1. กรมศุลกากร.2549. สถิติการนำเข้า-ส่งออก. http://www.customs.go.th.

2. จุมพล สาระนาค อรพรรณ วิเศษสังข์ และจักรพงษ์ เจิมศิริ. 2540. โรคผัก. คู่มือนักวิชาการภาคสนาม ฝ่ายวิเคราะห์และบริการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 กรมวิชาการเกษตร. 113 หน้า.

3. พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร สหมิตรพริ้นติ้ง อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี. 285 หน้า.

4. สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช : โรคและการจัดการ. วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ. 204 หน้า.

5. Anonymous 1996. Guidelines for pest risk analysis. ISPM Pub. No. 2, FAO, Rome.

6.Anonymous 2003. Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks. ISPM Pub. No. 11 Rev. 1, FAO, Rome.

7. CABI. 2007. Crop Protection Compendium [CD-ROM]. CAB International. Wallingford, UK.

8 . USDA, 2006. Treatment schedule 88 pp. *In* USDA Treatment manual. USDA-APHIS

การศึกษาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Study on Plant parasitic nematodes Associated with Imported Lily Bulbs

วานิช คำพานิช [1/] นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด [2/] วันเพ็ญ ศรีชาติ [1/]
ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ [2/]
[1/] กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การสืบค้นข้อมูลไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่จากรายงานที่มีในประเทศไทย และต่างประเทศ พบว่ามีไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่ทั้งหมดจำนวน 31 ชนิด พบในประเทศไทย จำนวน 16 ชนิด เป็นไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูพืชกักกันตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 จำนวน 8 ชนิด และจากการศึกษาไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และสาธารณรัฐประชาชนจีน ทางด่านตรวจพืชลาดกระบัง ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชเชียงแสน ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 - กันยายน 2552 จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Tylenchoryhnchus martini* และ *Aphelenchoides* sp. และหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนอีก จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ *Tylenchoryhnchus martini*, *Helicotylenchus multicinctus* และ *Meloidogyne incognita* และในการสำรวจ ติดตาม โดยการสุ่มตัวอย่างดินและหัวพันธุ์ลิลลี่ในแปลงปลูกที่ใช้หัวพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศในพื้นที่ภาคกลาง จังหวัดนนทบุรี และพื้นที่ภาคเหนือ จังหวัดเชียงราย เพื่อตรวจสอบหาชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช จำนวนทั้งหมด 7 แปลง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืช จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Tylenchoryhnchus martini*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Hoplolaimus seinhorsti*, *Meloidogyne incognita* และ *Rotylenchulus reniformis* ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้จะนำไปใช้ในการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชของการนำเข้าหัวพันธุ์ลิลลี่จากต่างประเทศเพื่อกำหนดมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลเพื่อลดความเสี่ยงศัตรูพืชอันเนื่องมาจากไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดที่ร้ายแรงซึ่งอาจติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้ามาในราชอาณาจักรและอาจจะมาแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อการปลูกลิลลี่ในประเทศไทยได้

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-03-03-01-51

คำนำ

ลิลลี่ (Lily, *Lilium* spp.) จัดเป็นสิ่งกำกัดตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ประเทศไทยได้มีการนำเข้าหัวพันธุ์ลิลลี่เป็นปริมาณมากเพื่อปลูกประดับความสวยงาม และเพื่อขยายพันธุ์ และภายใต้ข้อตกลงที่ว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการด้านสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary Measures หรือ SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการป้องกันมิให้ศัตรูพืชติดมากับพืชและผลิตผลพืชเข้ามาเป็นอันตรายหรือก่อให้เกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม ประเทศไทยจะต้องเปิดเสรีในฐานะที่เป็นประเทศสมาชิกองค์การการค้าโลก และจะต้องปฏิบัติตามกฎเกณฑ์เกี่ยวกับการค้าสินค้าเกษตร ภายใต้ข้อตกลงที่ว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการด้านสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช (Agreement on Application of Sanitary and Phytosanitary Measures หรือ SPS Agreement) ซึ่งเป็นมาตรการในการป้องกันมิให้เข้าไปเป็นอันตรายหรือเกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม วิธีการปฏิบัติคือประเทศผู้นำเข้าสินค้าเกษตรต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืช โดยทำการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) ซึ่งอาจจะเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ศัตรูพืช และวัชพืช ชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจจะติดมากับสินค้าเกษตรหรือแม้แต่หัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

ปัญหาการนำเข้านอกจากจะมีดิน และวัสดุปลูกติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ แล้วยังมีเชื้อโรคพืชได้แก่เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลง รวมทั้งอาจจะมีศัตรูพืชชนิดอื่นติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย และเป็นศัตรูพืชกักกันเช่น *Aphelenchoides fragariae*, *Ditylenchus destructor*,*D. dipsaci*, *Globodera pallida* (Biosecurity Australia, 2000; CPC, 2007; EPPO, 2006) และอาจจะมีไส้เดือนฝอยชนิดอื่นอีก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และใช้กำหนดมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลการนำเข้าหัวพันธุ์ลิลลี่ และลดความเสี่ยงศัตรูพืชอันเนื่องมาจากไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งอาจติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ และเข้ามาระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกลิลลี่ในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดิน วัสดุปลูก และหัวพันธุ์ลิลลี่
2. อุปกรณ์แยกไส้เดือนฝอย ได้แก่ เครื่องชั่ง ตะแกรง (sieve) ขนาด 60, 200 และ 325 mesh กรวยแก้ว (funnel) พร้อมสายยาง คลิ๊ปหนีบสายยาง ถังกะละมัง และเครื่องพ่นหมอก (mist Chamber)
3. เครื่องมือตัดเนื้อเยื่อ แท่งพาราฟิน พร้อมสีย้อมต่างๆ
4. อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ลิลลี่ ได้แก่ มีด กรรไกร เครื่องปั่น (blender)
5. อุปกรณ์ในการทำสไลด์ กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound
6. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น พลั่ว เสียม ถุงพลาสติก ยางรัด ปากกา
7. วัสดุวิทยาศาสตร์ต่าง ๆ
8. วัสดุเกษตรต่าง ๆ
9. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการย้อมสี เช่น acid fuchsine, cotton blue, lactophenol และ glycerine

วิธีการ

1. **สืบค้นข้อมูลไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่จากรายงานที่มีในประเทศไทยและต่างประเทศ**

ทำการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูล ตำราวิชาการ วารสารทางวิชาการ รายงานการประชุมและสัมมนาทางวิชาการ และเอกสารวิชาการที่สามารถสืบค้นข้อมูลจากแหล่งต่างๆ ทั่วโลก

2. **การตรวจสอบและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ**

2.1 ทำการตรวจสอบและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศดังต่อไปนี้ เนเธอร์แลนด์ และสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างวัสดุปลูกที่ล่วงหล่นอยู่ในตู้บรรจุสินค้า และตัวอย่างหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้า ณ ด่านตรวจพืชฯ จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 30 หัว)

2.2 ทำการแยกไส้เดือนฝอย และตรวจสอบด้วยวิธีดังต่อไปนี้ ทำการล้างตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากในตู้บรรจุสินค้า และที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ รวมทั้งนำตัวอย่างหัวพันธุ์ลิลลี่ ไปแยกไส้เดือนฝอยตามวิธีการ 2 วิธีการดังนี้

2.2.1 วิธีการของ Cobb's sieving & Baermann funnel (นุชนารถ, 2546; Zuckerman *et al*., 1990) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำตัวอย่างวัสดุปลูกหรือพืชประมาณ 500 กรัม นำไปหั่นเป็นชิ้นๆ หรือปั่นและนำมาใส่ในภาชนะพลาสติกเทน้ำลงไปปริมาณที่เท่ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30 วินาที เพื่อให้นอน

ก้น แล้วเทน้ำลงในตะแกรงขนาด 60 mesh (ความยาว 1 นิ้วมี 60 ช่อง) โดยมีภาชนะรองรับ เศษพืช เศษไม้ จะติดอยู่บนตะแกรง

2. นำน้ำที่ผ่านตะแกรงแรกแล้วมาเทลงในตะแกรงขนาด 200 mesh โดยมีภาชนะรองรับ ไส้เดือนฝอยที่มีขนาดเล็กจะผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะที่รองรับอยู่ด้านล่าง จะมีไส้เดือนฝอยบางชนิดที่มีขนาดใหญ่ค้างอยู่บนตะแกรง เอาน้ำฉีดบนตะแกรงจนน้ำใส แล้วใช้น้ำฉีดด้านหลังตะแกรง โดยมีภาชนะรองรับไส้เดือนฝอย

3. นำน้ำที่ผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh เทลงในตะแกรงขนาด 325 mesh โดยไม่ต้องมีภาชนะรองรับ เนื่องจากไส้เดือนฝอยเกือบทุกชนิดจะติดอยู่บนตะแกรงนี้ ใช้ฝอยน้ำฉีดเบาๆให้ทั่วตะแกรงเพื่อให้ตะกอนหลุดลงมา หลังจากนั้นเก็บน้ำจากตะแกรงนี้ไว้เพื่อกรองต่อไป

4. นำน้ำที่กรองจากตะแกรงขนาด 325 mesh เทลงบนตะแกรงลวดที่มีกระดาษกรองวางอยู่ด้านบน (ใช้กระดาษกรองไส้เดือนฝอย หรือกระดาษเช็ดหน้า 2 ชั้น) แล้วนำตะแกรงลวดวางบนกรวยที่มีท่อยางสวมไว้ ในกรวยบรรจุน้ำปลายท่อยางมีคลิ๊ปหนีบสายยางกันน้ำรั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะว่ายน้ำไชผ่านกระดาษกรองมาอยู่ที่ปลายก้านกรวย

5. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ไขน้ำจากกรวยตัวอย่างทั้งหมดไปตรวจสอบ และจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบจากคู่มือการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยทั้งประเทศไทย (สืบศักดิ์, 2538; 2541) และต่างประเทศ (Anon, 2005; Bell, 2004; Hunt, 1993; Nickle, 1991; Siddiqi, 2000)

2.2.2 วิธีการใช้เครื่องพ่นหมอก (mist chamber) (นุชนารถ และวานิช, 2551) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมตัวอย่างหัวพันธุ์ลิลลี่ หั่นรากและกลีบของหัวพันธุ์ให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปใส่ในถุงผ้ากรองชนิดเนื้อผ้าละเอียด น้ำหนักหัวพันธุ์ประมาณ 20 กรัม/1 ตัวอย่าง/1 ถุง

2. การเตรียมกรวยแยก นำกรวยแก้วต่อสายยางที่ก้านกรวยและใช้คลิ๊ปหนีบสายยาง เทน้ำสะอาดใส่ลงไปในกรวย นำไปตั้งวางในเครื่องพ่นหมอก หลังจากนั้นนำตัวอย่างรากและกลีบของหัวพันธุ์ที่อยู่ในถุงผ้าวางบนตะแกรงลวดที่อยู่บนกรวยพลาสติก นำไปซ้อนบนกรวยแก้ว

3. เปิดเครื่องพ่นหมอก ปล่อยน้ำตามท่อสายยางผ่านหัวพ่นฝอย ที่ติดตั้งไว้ด้านบนของกรวย เปิดเครื่องพ่นฝอยตลอด 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นไขน้ำจากปลายสายยางกรวยแก้วใส่ภาชนะแก้วใสหรือบีกเกอร์ ในปริมาตรน้ำ 50 มิลลิลิตร

4. นำน้ำที่ได้ไปตรวจหาไส้เดือนฝอย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ และจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบจากคู่มือการจัดจำแนก

ชนิดของไส้เดือนฝอยทั้งประเทศไทย (สืบศักดิ์, 2538; 2541) และต่างประเทศ (Anon, 2005; Bell, 2004; Hunt, 1993; Nickle, 1991; Siddiqi, 2000)

3. การสำรวจและติดตามไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงปลูกลิลลี่ที่ใช้หัวพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน และพืชที่พบลักษณะอาการผิดปกติหรืออาการที่สงสัยว่าจะมีไส้เดือนฝอยศัตรูพืชระบาดอยู่ในแปลงปลูกลิลลี่ที่ใช้หัวพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศในพื้นที่กลาง และภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดนนทบุรี และ จังหวัดเชียงราย จำนวนทั้งหมด 7 แปลง ซึ่งวิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 สุ่มตัวอย่างดินในพื้นที่ปลูกลิลลี่ประมาณ 10 -15 จุด ต่อ 1 ตัวอย่าง แต่ละจุดห่างกันประมาณ 5 - 10 เมตร หรือประมาณ 15 จุดต่อพื้นที่ 50 ตารางเมตร

3.2 ตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจะมีน้ำหนักประมาณ 0.5 -1.0 กิโลกรัม

3.3 หลังจากสุ่มตัวอย่างแล้วทำการตรวจสอบและแยกไส้เดือนฝอยตามวิธีของ Cobb's sieving & Baermann funnel ดังวิธีการข้อ 2 และนำตัวอย่างที่ได้ไปจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ ทำการบันทึกผลการสำรวจและติดตามไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงปลูกลิลลี่ และจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และแบบ compound ในห้องปฏิบัติการ โดยเทียบจากคู่มือการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยทั้งประเทศไทย (สืบศักดิ์, 2538; 2541) และต่างประเทศ (Anon, 2005; Bell, 2004; Hunt, 1993; Nickle, 1991; Siddiqi, 2000)

เวลาและสถานที่

- **ระยะเวลา** เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2550 และสิ้นสุด เดือนกันยายน 2552
- **สถานที่** กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ด่านตรวจพืชฯ สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และแปลงเกษตรกรผู้ผลิตลิลลี่ในพื้นที่จังหวัดภาคกลางและภาคเหนือ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่จากรายงานที่มีในประเทศไทย และต่างประเทศ

จากการสืบค้นข้อมูลไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่จากรายงานที่มีในประเทศไทย และต่างประเทศ ได้มีรายงานไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่ทั้งหมด 31 ชนิด พบในประเทศไทยจำนวน 16 ชนิด เป็นไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ทั้งหมด 8 ชนิด ที่เป็นศัตรูพืชสำคัญของลิลลี่ได้แก่

1. *Aphelenchoides besseyi* มีชื่อสามัญว่า Rice leaf nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทฝังส่วนหัวบางส่วนไว้ในเนื้อเยื่อพืช (ectoparasite) และบางครั้งสามารถเคลื่อนย้ายอยู่ภายในรากพืช (migratory endoparasite) มีพืชอาศัย เช่น สตรอเบอรี่ ข้าว ลิลลี่ หอมหัวใหญ่ เบญจมาศ กกทราย ถั่วเหลือง พืชสกุลปอ มันเทศ และ ข้าวโพด ไส้เดือนฝอยเมื่อเข้าทำลายพืชทำให้พืชแสดงอาการดังนี้ ใบมีรูปร่างผิดปกติ ต้นพืชเจริญเติบโตช้าและแคระแกร็น นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ยังสามารถเข้าทำลายหัวพันธุ์ ใบ ดอก เมล็ดของพืช รวมทั้งทำให้ผลผลิตลดลงได้ (CPC, 2007)

2. *Aphelenchoides ritzemabosi* มีชื่อสามัญว่า leaf and bud nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทฝังส่วนหัวบางส่วนไว้ในเนื้อเยื่อพืช (ectoparasite) และบางครั้งสามารถเคลื่อนย้ายอยู่ภายในรากพืช (migratory endoparasite) มีพืชอาศัย เช่น เบญจมาศ แอสเตอร์ ลิลลี่ ทานตะวัน กุหลาบ มะเขือเทศ ยาสูบ บานชื่น ไส้เดือนฝอย *A. ritzemabosi* เข้าทำลายส่วนของกลีบหัวโดยเข้าไปทางช่องเปิดธรรมชาติทำให้พืชแสดงอาการกลีบไหม้ บางครั้งทำให้หัวมีขนาดและรูปร่างผิดปกติ และทำให้ผลผลิตลดลงได้ ไส้เดือนฝอยชนิดนี้พบในสภาพภูมิประเทศเขตหนาว พบในทวีปอเมริกาใต้ยุโรป เขตมหาสมุทรแปซิฟิคบางพื้นที่ (CPC, 2007)

3. *Ditylenchus destructor* มีชื่อสามัญว่า potato rot nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทเคลื่อนย้ายและเข้าทำลายภายในส่วนของพืชที่อยู่ใต้ดิน (migratory endoparasite) ได้แก่ ราก และส่วนของพืชที่พัฒนาอยู่ใต้ดิน เช่น ลิลลี่ หัวมันฝรั่ง กระเทียม เป็นต้น โดยไส้เดือนฝอยเข้าทำลายภายในหัวผ่านทาง lenticels จากนั้นเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว และทำลายจนหมดทั้งหัว และยังสามารถคงความมีชีวิต และพัฒนาอยู่ในส่วนของหัวหลังการเก็บเกี่ยวได้ ไส้เดือนฝอย *D. destructor* สามารถเคลื่อนย้ายในดินได้เป็นระยะสั้นๆ วิธีการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยที่สำคัญ โดยติดไปกับหัวหรือส่วนของพืชอาศัยใต้ดิน การเคลื่อนย้ายดินและน้ำชลประทานก็เป็นสาเหตุทำให้แพร่กระจายไปในแหล่งปลูกพืชอื่นๆได้ นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ยังมีระยะฟักตัวที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อม จึงเป็นปัญหาในพื้นที่ผลิตที่มีสภาพอากาศหนาวเย็น และความชื้นสูง แต่ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ไม่ทนทานต่อความแห้งแล้ง และไม่มีการสร้าง eel worm wool ถึงแม้ว่าไส้เดือนฝอยสามารถเคลื่อนย้ายในดินได้ในระยะสั้นๆ แต่สามารถเคลื่อนย้ายไปไกลๆ ได้โดยติดไปกับหัว มันฝรั่ง หรือส่วนของพืชใต้ดินอื่นๆ หรือติดไปกับดิน เครื่องมือการเกษตร น้ำชลประทาน และมนุษย์ *D. destructor* มีพืชอาศัยที่สำคัญ เช่น **ลิลลี่** มันฝรั่ง หอม กระเทียม หัวบีท พริก มะเขือเทศ มะเขือม่วง แตงกวา ฟักทอง แครอท มันเทศ ข้าวโพด ส้ม สตรอเบอร์รี ฮอพ ไอริส ทิวลิป เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายพืชทำให้แสดงอาการดังนี้ เปลือกของหัว มีจุดเล็กๆ และมีสีขาวบนหัว เมื่อขยายเป็นวงกว้าง จึงเปลี่ยนเป็นฝอยสีดำ และเน่าในที่สุด ถ้าเก็บไว้ในสภาพที่มีความชื้น หัวที่เน่า ไส้เดือนฝอยจะแพร่กระจายไปยังหัวอื่นได้ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการรากเน่า ส่วนของพืชที่

อยู่เหนือดิน แสดงอาการผิวแตก และใบเหลือง ไส้เดือนฝอยชนิดนี้พบในสภาพภูมิประเทศเขตหนาว พบในทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป เขตเมดิเตอร์เรเนียน และทวีปเอเชียบางพื้นที่ นอกจากนี้ *D. destructor* เป็นศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของลิลลี่ไส้เดือนฝอยสามารถอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (CPC, 2007)

4. ***Ditylenchus dipsaci*** มีชื่อสามัญว่า stem and bulb nematode เป็นไส้เดือนฝอยที่ทำลายภายในเนื้อเยื่อพืช (endoparasite) ส่วนของลำต้นและหัวทำให้ผนังเซลล์แตก ส่วนของพืชบนดิน (ลำต้น ใบ ดอก) บวมและบิดเบี้ยวและเกิดอาการเซลตายและเน่าของโคนลำต้น หัวและส่วนของลำต้นใต้ดิน และระหว่างการเก็บรักษาหัวในห้องเย็น ทั้งไส้เดือนฝอยและอาการเน่ายังคงพัฒนาก่อให้เกิดความเสียหายต่อไปได้ วงจรชีวิตของ *D. dipsaci* ในต้นหัวหอมที่สภาพอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 วัน ช่วงเวลาของวงจรชีวิตขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความแตกต่างของไส้เดือนฝอยจากแหล่งต่างๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและทำให้มีความสามารถในการเข้าทำลายสูงที่สุด อยู่ระหว่าง 10-20 องศาเซลเซียส ตัวเต็มวัยเพศเมียแต่ละตัวสามารถวางไข่ได้ 200-500 ฟอง ตัวอ่อนทั้ง 4 ระยะมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว ภายใต้ผิวเนื้อเยื่อพืชที่ถูกทำลาย เพื่อสร้างกลุ่มของ eelworm wool ซึ่งสามารถอยู่รอดในสภาพแห้งได้เป็นเวลาหลายปี โดยอาจติดไปกับเมล็ดของพืชอาศัย *D. dipsaci* อาจทนทานในดินเหนียวได้เป็นเวลาหลายปี นอกจากนี้สภาพที่เย็นและชื้นส่งเสริมให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้ง่าย *D. dipsaci* มีพืชอาศัย เช่น ลิลลี่ หอม กระเทียม มันฝรั่ง ข้าวโพด หัวบีท ยาสูบ ทิวลิป ว่านสี่ทิศ คาร์เนชั่น ทานตะวัน ถั่วลันเตา มันเทศ ข้าวสาลี พืชตระกูลแตง เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายทำให้เกิดอาการดังนี้มล็ดพันธุ์มีสีดำ รูปร่างผิดปกติ มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดปกติ และอาจมีจุดเล็กๆบนผิวของเมล็ดพันธุ์พืช ผลผลิตลดลงและยังทำให้คุณภาพลดลงด้วย เช่นทำให้เมล็ดพันธุ์มีสีดำ รูปร่างผิดปกติ มีขนาดเล็กกว่าเมล็ดปกติ อาจมีจุดเล็กๆบนผิวของเมล็ดพันธุ์พืช และยังทำให้หัวพันธุ์เน่า และจากการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืช พบว่า มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง แหล่งแพร่ระบาดทั่วโลก สามารถถ่ายทอดโรคทางเมล็ดพันธุ์ได้ ไส้เดือนฝอยชนิดนี้บางครั้งเข้าทำลายพืชร่วมกับเชื้อโรคพืชนิดอื่นก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชอาศัยได้มากกว่าการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยตามลำพัง และมีรายงานความเสียหายจากการเข้าทำลายของ *D. dipsaci* ทำให้สูญเสียผลผลิตถึง 60-80 เปอร์เซ็นต์ ในประเทศอิตาลีรายงานว่าต้นกล้าหอมตายถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ก่อนถึงระยะการย้ายปลูกและกระเทียมสูญเสียผลผลิตถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะนี้กระเทียมที่ปลูกที่ประเทศฝรั่งเศส และโปแลนด์ สูญเสียผลผลิตมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (CPC, 2007)

5. ***Globodera pallida*** มีชื่อสามัญว่า white potato cyst nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทฝังตัวอยู่ภายในพืชส่วนใดส่วนหนึ่งตลอดไปโดยไม่มีการเคลื่อนย้าย (sedentary endoparasite) ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ เพศเมียสามารถสร้างซีสต์ (cyst) ได้ ซึ่งซีสต์ในระยะเริ่มแรกจะ

มีสีขาวบริสุทธิ์ และสีน้ำตาลเข้ม ไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลายพืชได้ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ส่วนไข่ของไส้เดือนฝอยจะอยู่ภายในซีสต์ ซึ่งบรรจุไข่ไว้มากกว่า 500 ฟองต่อซีสต์ ไข่สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ภายในซีสต์ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมไข่จึงออกจากซีสต์ และเข้าทำลายพืชในลำดับต่อไป ไส้เดือนฝอย *G. pallida* สามารถวางไข่ได้ในอุณหภูมิประมาณ 10 องศาเซลเซียส หรือน้อยกว่า และสามารถปรับตัวได้ในสภาพอากาศเย็น อุณหภูมิระหว่าง 10-18 องศาเซลเซียส (Franco, 1979) วงจรชีวิต ไส้เดือนฝอยชนิดนี้มีวงจรชีวิตประมาณ 45 วัน โดยตัวอ่อนระยะที่ 2 จะเข้าทำลายพืช วางไข่ และเริ่มทำลายปลายราก และเคลื่อนที่ไปตามส่วนของราก หรือหัวพันธุ์ที่เหมาะสมจึงเข้าไปฝังตัวและดูดกินอาหารจากรากหรือหัวพันธุ์พืช จนกระทั่งก่อนตายจะสร้างซีสต์ขึ้นมาห่อหุ้มไข่และตัวอ่อนไว้ ไส้เดือนฝอย *G. pallida* มีพืชอาศัยที่สำคัญ เช่น พืชในวงศ์ Solanaceae ได้แก่มันฝรั่ง มะเขือเทศ มะเขือม่วง นอกจากนี้ยังเข้าทำลายหัวพันธุ์ของพืชบางชนิดอื่นๆ เช่นทิวลิป ลิลลี่ หอม เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืช ทำให้เกิดอาการจะชะงักการเจริญเติบโต ใบเหลือง และเหี่ยว ส่วนของลำต้น มีรอยแตก และเมื่อทำลายราก และหัวพันธุ์จะทำให้รากเน่า และแห้งตายในที่สุด และพบซีสต์บริเวณรากหรือหัวพันธุ์ที่ถูกทำลาย (CPC, 2007)

6. ***Hoplolaimus indicus*** มีชื่อสามัญว่า lance nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทฝังส่วนหัวบางส่วนไว้ในเนื้อเยื่อพืช และบางชนิดสามารถเคลื่อนย้ายอยู่ภายในรากพืช อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ประมาณ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง 7 อยู่ได้ในดินร่วนปนทราย และมีความชื้นในดิน 16 เปอร์เซ็นต์ (Gupta and Atwal, 1971) มีวงจรชีวิต 4-5 สัปดาห์ ต่อรุ่น *H. indicus* มีพืชอาศัย เช่น ลิลลี่ ข้าว กระเจี๊ยบ ถั่วลิสง กะหล่ำ พริก ส้ม แตงกวา ฝ้าย มันเทศ มะเขือเทศ มันฝรั่ง มะม่วง ท้อ ฝรั่ง อ้อย มะเขือม่วง กล้วย ส้ม ข้าวโพด และวัชพืชบางชนิด เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายพืชจะทำลายระบบราก ทำให้ปลายรากเป็นแผลยาว และรากเริ่มกุด โค้งงอ และระบบรากลดลง ส่วนที่อยู่เหนือดินชะงักการเจริญเติบโต ใบเริ่มเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง มีรายงานการแพร่ระบาดในแปลงประเทศ อินเดีย ทำให้ผลผลิตลดลง (CPC, 2007)

7. ***Meloidogyne chitwoodi*** มีชื่อสามัญว่า Columbia root - knot nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทฝังส่วนหัวบางส่วนไว้ในเนื้อเยื่อพืช มีวงจรชีวิต 3-4 สัปดาห์ ภายใต้สภาพแวดล้อมเหมาะสม ตัวอ่อนที่ออกจากไข่จะอยู่ในดินและรากพืช ตัวอ่อนระยะที่ 2 จะเริ่มเข้าทำลายรากพืช ตั้งแต่ปลายราก เข้าไปในเนื้อเยื่อของพืช ทำให้เกิดแผล และเคลื่อนที่เข้าไปข้างในเซลรากพืช และเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้รากพืชเป็นปุ่มปมตามไปด้วยมีแผลเซลบริเวณเนื้อเยื่อติดท่อน้ำท่ออาหาร (cortex) ตัวอ่อนหลังจากเข้าทำลายรากพืชจะมีลักษณะโป่งพอง และเปลี่ยนแปลงรูปร่างคล้ายไส้กอก หลังจากนั้นจะหยุดการเคลื่อนย้าย และกินอาหาร มีการลอกคราบอีก 3 ครั้ง เข้าสู่ระยะตัวเต็มเพศผู้ ที่มีรูปร่างเพรียว (slender) หรือเพศเมีย ที่มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ (vermiform bodies) และหลังจากนั้นไส้เดือนฝอยจึงออกจากรากพืช *M. chitwoodi* เมื่อ

ผ่านเข้าสู่ฤดูหนาว ไข่หรือตัวอ่อนสามารถอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำ วางไข่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเข้าทำลายพืชที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ไส้เดือนฝอย *M. chitwoodi* มีพืชอาศัยกว้างเช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ แครอท ผักกาดหัว ลิลลี่ ทิวลิป แกลดิโอลัส ข้าวโพด ข้าวสาลี พืชตระกูลแตง ตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายทำให้พืชแสดงอาการดังนี้ ส่วนที่อยู่เหนือดิน ต้นชะงักการเจริญเติบโต ใบซีด และเหลือง และตายในที่สุด ส่งผลให้ผลผลิตลดลง ส่วนที่อยู่ใต้ดิน เช่นรากและหัวพันธุ์มีอาการบวม พอง เป็นปุ่มปม ลิลลี่ที่ถูก *M. chitwoodi* เข้าทำลายแล้วให้มีมูลค่าทางการตลาดลดลง (CPC, 2007)

8. ***Xiphinema diversicaudatum*** มีชื่อสามัญว่า dagger nematode เป็นไส้เดือนฝอยประเภทฝังส่วนหัวบางส่วนไว้ในเนื้อเยื่อพืช มีวงจรชีวิต 6 ระยะ ได้แก่ระยะไข่ ตัวอ่อน 4 ระยะ และจึงเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย มีพืชอาศัย เช่น หัวบีท องุ่น สตรอเบอร์รี พลัม ท้อ กระเทียม เบญจมาศ ลิลลี่ มันฝรั่ง มะเขือเทศ ไส้เดือนฝอย *X. diversicaudatum* เมื่อเข้าทำลายทำให้พืชแสดงอาการดังนี้ ปลายรากม้วนงอ เป็นปุ่ม ปม ซึ่งส่งผลทำให้ต้นชะงักการเจริญเติบโต ส่วนลักษณะโดยอ้อมไส้เดือนฝอยสามารถถ่ายทอดไวรัส arabis mosaic virus (ArMV) และ strawberry latent ringspot nepoviruses (SLRSV) (CPC, 2007)

นอกจากนี้ยังมีไส้เดือนฝอยที่ยังไม่รายงานในประเทศไทย และควรเฝ้าระวังอีกหลายชนิด เช่น *Aphelenchus avenae*, *Paratrichodorus porosus* และในการจะควบคุมไส้เดือนฝอยนั้นจะต้องใช้มาตรการทางกักกันพืช (CPC, 2007)

2. การตรวจสอบและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

สุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์ลิลลี่นำเข้า ณ ด่านตรวจพืชเพื่อตรวจสอบ และจำแนกชนิดหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่างโดยมีตัวอย่างที่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์จำนวน 20 ตัวอย่าง ผลการตรวจพบไส้เดือนฝอยติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ 3 ชนิดได้แก่ *Aphelenchoides* sp., *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Tylenchoryhnchus martini* และตัวอย่างที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนจำนวน 5 ตัวอย่าง ตรวจสอบพบไส้เดือนฝอย 3 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus multicinctus*, *Tylenchoryhnchus martini* และ *Meloidogyne incognita* ซึ่งไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดมีลักษณะโดยทั่วไปดังต่อไปนี้

1. ***Aphelenchoides*** **sp.** มีลักษณะทั่วไป ตัวอ่อนมีลักษณะเรียวยาว มีความยาว 0.39 - 0.44 ไมครอน มีหลอดดูดอาหารที่จางมาก ไม่สามารถระบุเพศของไส้เดือนฝอยได้จึงไม่สามารถจำแนกในระดับชนิด (species) ได้เนื่องจากตรวจพบตัวอ่อนในปริมาณที่น้อยแต่ไส้เดือนฝอยสกุลนี้ยังมีอีกหลายชนิดที่มีศักยภาพในการเข้าทำลายหัวพันธุ์ ต้น ใบ และดอกของลิลลี่ ไม้ดอก ไม้

ประดับ และพืชเศรษฐกิจในอณาคต ไส้เดือนฝอยที่สำคัญได้แก่ *Aphelenchoides besseyi*, *A.fragariae*, *A. ritzemabosi*

2. ***Helicotylenchus multicinctus*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.52 มิลลิเมตร เมื่อตายลำตัวจะโค้งเป็นรูปตัวซี ส่วนหัวค่อนข้างกลม หลอดดูดอาหาร (stylet) ยาว 24.0 ไมครอน ต่อมสร้างน้ำย่อย(esophageal gland) เป็นกระเปาะย้อยทับลำไส้ใหญ่ทางด้านหน้า มีช่องคลอด (vulva) อยู่ที่ 74.5 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวลำตัว มีรอยย่นตลอดลำตัว หางสั้น และโค้งงอแบบครึ่งวงกลม

3. ***Helicotylenchus pseudorobustus*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.4 -1.2 มิลลิเมตร เมื่อตายลำตัวจะโค้งคล้ายเกลียว (spiral) หรือม้วนงอคล้ายเลขหนึ่งส่วนหัวค่อนข้างกลม หลอดดูดอาหาร (stylet) ยาวประมาณ 27 ไมครอน ต่อมสร้างน้ำย่อย (esophageal gland) เป็นกระเปาะย้อยทับลำไส้ใหญ่ทางด้านท้อง มีช่องคลอด (vulva) อยู่ที่ 61 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวลำตัว มีรอยย่นตลอดลำตัว หางสั้น และโค้งงอแบบครึ่งวงกลม

4. ***Meloidogyne incognita*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.5-0.72 มิลลิเมตร ความกว้าง 0.33-0.52 มิลลิเมตร หลอดดูดอาหารยาว 13.6-15.8 ไมครอน ไส้เดือนฝอยชนิดนี้มีลำตัวค่อนข้างกลม มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ isthmus สั้น ซ้อนทับ basal bulb ลักษณะ perineal pattern เป็นเส้นขยุกขยิก เป็นเส้นสานกันคล้ายซ้อม dosal arch สูง

5. ***Tylenchoryhnchus martini*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.70 มิลลิเมตร หัวกลม หลอดดูดอาหารยาว 18.5 ไมครอน ไส้เดือนฝอยชนิดนี้เมื่อตายลำตัวทางด้านท้องโค้งเล็กน้อย ปลายหางมนกลม ส่วนตัวผู้ มีความยาว 0.56 มิลลิเมตร หลอดดูดอาหารยาว 15 ไมครอน หางยาว ปลายหางเป็นรูปกรวย มีเดือยแหลมที่ใช้ปล่อยน้ำเชื้อ ขนาด 20 ไมครอน ส่วนของแพนหางคลุมถึงปลายหาง และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 5 ชนิดนี้ไม่มีความสำคัญกับหัวพันธุ์ลิลลี่โดยตรง เพียงแต่ทำให้รากเป็นแผล ส่วนใหญ่มีรายงานอยู่ในประเทศไทย

แต่อย่างไรก็ตามยังจะต้องมีการเฝ้าระวัง และตรวจสอบต่อไปเพราะว่ายังมีไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งอาจติดมาหัวพันธุ์ลิลลี่และเข้ามาระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกลิลลี่ในประเทศไทยได้ เช่นไส้เดือนฝอย *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi*, *Ditylenchus destructor, D. dipsaci*, *Globodera pallida*, *Hoplolaimus indicus*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Paratrichodorus porosus* และ *Xiphinema diversicaudatum* เป็นต้น

3. การสำรวจและติดตามไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแปลงปลูกลิลลี่ที่ใช้หัวพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

สุ่มเก็บตัวอย่างดินและหัวพันธุ์ลิลลี่ในพื้นที่ภาคกลาง คือ จังหวัดนนทบุรี จำนวน 2 แปลง พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus multicinctus*, *Tylenchoryhnchus martini* และ พื้นที่ภาคเหนือ คือ จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 แปลง พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืช 6 ชนิด ได้แก่ *Helicotylenchus pseudorobustus*, *Tylenchoryhnchus martini*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Hoplolaimus seinhorsti*, *Meloidogyne incognita* และ *Rotylenchulus reniformis* ซึ่งไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดมีลักษณะโดยทั่วไปดังต่อไปนี้

1. ***Helicotylenchus multicinctus*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.5 มิลลิเมตร เมื่อตายลำตัวจะโค้งเป็นรูปตัวซี ส่วนหัวค่อนข้างกลม หลอดดูดอาหาร (stylet) แข็งแรง มีความยาว ยาว 23.5 ไมครอน ต่อมสร้างน้ำย่อย (esophageal gland) เป็นกระเปาะย้อยทับลำไส้ใหญ่ทางด้านหน้า ช่องคลอด (vulva) อยู่ที่ 68.5 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวลำตัว มีรอยย่นตลอดลำตัว หางสั้น และโค้งงอแบบครึ่งวงกลม

2. ***Helicotylenchus pseudorobustus*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.4 -1.2 มิลลิเมตร เมื่อตายลำตัว จะโค้งรูปร่างเกลียว (spiral) หรือม้วนงอคล้ายเลขหนึ่ง ส่วนหัวค่อนข้างกลม หลอดดูดอาหาร (stylet) ยาวประมาณ 27 ไมครอนต่อมสร้างน้ำย่อย(esophageal gland) เป็นกระเปาะย้อยทับลำไส้ใหญ่ทางด้านท้อง มีช่องคลอด (vulva) อยู่ที่ 61 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวลำตัว มีรอยย่นตลอดลำตัว หางสั้น และโค้งงอแบบครึ่งวงกลม

3. ***Hoplolaimus seinhorsti*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 12.62 มิลลิเมตร หลอดดูดอาหารยาว 55.8 ไมครอน ลำตัวทรงกระบอก ผิวหนังมีรอยย่นชัดเจนตลอดลำตัว ริมฝีปากค่อนข้างนูน ส่วนของหัวค่อนข้างตั้ง และโค้ง basal knob คล้ายกลีบดอกบัว median bulb กลม ทางเดินอาหารส่วนท้ายซ้อนทับลำไส้ ช่องออกไข่อยู่ประมาณกึ่งกลางลำตัว ปากช่องช่องคลอด (vulva) มีลักษณะคล้ายเขี้ยวยื่นออกมา ไม่พบ spermatheca ลำตัวไม่ซ้อนทับ rectum มีปลายหางกลมมน

4. ***Meloidogyne incognita*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.5-0.72 มิลลิเมตร ความกว้าง 0.33-0.52 มิลลิเมตร หลอดดูดอาหารยาว 13.6-15.8 ไมครอน ไส้เดือนฝอยชนิดนี้มีลำตัวค่อนข้างกลม มีรูปร่างคล้ายลูกแพร์ isthmus สั้น ซ้อนทับ basal bulb ลักษณะ perineal pattern เป็นเส้นขยุกขยิก เป็นเส้นสานกันคล้ายซ้อม dosal arch สูง

5. ***Rotylenchulus reniformis*** มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.45 มิลลิเมตร หลอดดูดอาหารแข็งแรง และมีความยาว 16.2 ไมครอน median bulb กลมรี ทางเดินอาหารส่วนท้ายซ้อนทับลำไส้ด้านท้อง หางเรียวยาว ปลายหางมนไม่มีรอยย่นและมีเส้นข้างลำตัว 4 เส้น (สืบศักดิ์, 2538) ส่วนตัวผู้ มีความยาว 0.41 มิลลิเมตร ริมฝีปากนูนไม่แยกจากลำตัว หลอดดูดอาหารค่อนข้างบางยาว 15.9 ไมครอน แพนหางคลุมเฉพาะเดือยแหลม (spicule) เดือยแหลมที่ใช้

ปล่อยน้ำเชื้อ ขนาด 21.5 ไมครอน ไส้เดือนฝอยชนิดนี้สามารถเข้าทำลายพืชได้โดยการดูดกินทำให้พืชแคระแกรน ใบเหลือง ระบบรากไม่แข็งแรง ต้นพืชล้มง่ายและตายไปในที่สุด

6. *Tylenchoryhnchus martini* มีลักษณะทั่วไป ตัวเมียมีความยาว 0.73 มิลลิเมตร หัวกลม หลอดดูดอาหารยาว 18.5 ไมครอน ลำตัวทรงกระบอก ผนังลำตัวย่นเล็กน้อย ริมฝีปากกลม ประกอบด้วยรอยย่น 3 รอย basal knob กลม median bulb กลมรี basal bulb ปลายกลมมนเป็นกระเปาะติดต่อกับลำไส้โดยไม่ซ้อนทับกัน มีรังไข่ 1 คู่ ปลายเหยียดตรง หางมีทรงกระบอก ไส้เดือนฝอยชนิดนี้เมื่อตายลำตัวโค้งเล็กทางด้านท้อง

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 6 ชนิดนี้ ส่วนใหญ่มีรายงานอยู่ในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามยังจะต้องมีการเฝ้าระวัง และตรวจสอบต่อไปเพราะว่ายังมีไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งอาจติดมาหัวพันธุ์ลิลลี่และเข้ามาระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกลิลลี่ในประเทศไทยได้ เช่น *Aphelenchus avenae*, *Aphelenchoides besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi*, *Ditylenchus destructor*, *D. dipsaci*, *Globodera pallida*, *Hoplolaimus indicus*, *Meloidogyne chitwoodi*, *Paratrichodorus porosus* และ *Xiphinema diversicaudatum* เป็นต้น

สรุปผลการทดลองและคำเสนอแนะ

1. การสืบค้นข้อมูลไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่จากรายงานที่มีในประเทศไทยและต่างประเทศมีรายงานไส้เดือนฝอยศัตรูพืชของลิลลี่ทั้งหมด 31 ชนิด พบในประเทศไทยจำนวน 16 ชนิด เป็นไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูพืชกักกันตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 จำนวน 8 ชนิด

2. จากการศึกษา ตรวจสอบและจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับและหัวพันธุ์ลิลลี่ที่นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์ และสาธารณรัฐประชาชนจีน ทางด่านตรวจพืชลาดกระบัง ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชเชียงแสน ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 - กันยายน 2552 จำนวนทั้งหมด 25 ตัวอย่าง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจำนวน 5 ชนิด ซึ่งไม่เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน แต่ยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบอย่างละเอียดต่อไปเพื่อป้องกันการแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกลิลลี่ในประเทศไทย

3. ในการสำรวจ ติดตามไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับดินและหัวพันธุ์ลิลลี่ในแปลงปลูกที่ใช้หัวพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศในพื้นที่ภาคกลาง และพื้นที่ภาคเหนือ จำนวนทั้งหมด 7 แปลง ตรวจพบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชจำนวน 6 ชนิด ซึ่งไม่เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน แต่อย่างไรก็ตามยังมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบ และสำรวจติดตามในทุกๆ พื้นที่ที่มีการปลูกลิลลี่ที่ใช้หัว

พันธุ์ที่นำเข้า เพื่อป้องกันมิให้ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดที่ร้ายแรงติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ซึ่งอาจจะมาแพร่ระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกลิลลี่ในประเทศไทยต่อไป

4. สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชและกำหนดมาตรการในการควบคุมกำกับดูแลการนำเข้าหัวพันธุ์ลิลลี่และลดความเสี่ยงศัตรูพืชอันเนื่องมาจากไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ร้ายแรงซึ่งอาจติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่ เช่น ต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืช (Phytosanitary certificate; PC) ในใบรับรองสุขอนามัยพืช ต้องระบุข้อความว่าปลอด หรือปราศจากไส้เดือนฝอยที่เป็นศัตรูพืชกักกัน 8 ชนิด ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ได้แก่ *Aphelenchoides besseyi*, *A. ritzemabosi*, *Ditylenchus destructor, D. dipsaci*, *Globodera pallida*, *Hoplolaimus indicus*, *Meloidogyne chitwoodi* และ *Xiphinema diversicaudatum* รวมทั้งตรวจสอบศัตรูพืชเบื้องต้น ณ ด่านตรวจ หรือ ณ จุดนำเข้า พร้อมสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบศัตรูพืชที่อาจจะติดมากับหัวพันธุ์ลิลลี่

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชลาดกระบัง ด่านตรวจพืชท่าเรือกรุงเทพฯ และด่านตรวจพืชเชียงแสน สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในด้านการเก็บตัวอย่าง และเอื้ออำนวยในเรื่องสถานที่

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2546. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช.กลุ่มงานไส้เดือนฝอย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 39 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วานิช คำพานิช 2551. การพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้าและส่งออก. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 8 หน้า.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2538. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในประเทศไทย. วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ. 275 หน้า.

สืบศักดิ์ สนธิรัตน. 2541. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช: โรคและการจัดการ. วี.บี. บุ๊คเซ็นเตอร์, กรุงเทพฯ. 204 หน้า.

Anon. 2005. Interactive diagnostic key to plant parasitic, freeliving and predaceous nematodes. University of Nebraska - Lincoln Nematology Laboratory, http://nematode.unl.edu/key/nemakey.htm.

Bell, M. 2004. Plant Parasitic Nematodes: Lucid key to 30 genera of plant parasitic nematodes. http://www.lucidcentral.com/keys/nematodes/.

Biosecurity Australia. 2000. Draft IRA Report, Non-Routine Import Risk Analysis (IRA) on ornamental Bulbs from The Netherlands, the United kingdom, Israel and New Zealand, Draft IRA Report.

CPC. 2007. Crop Protection Compendium, 2007 ed. Wallingford, UK: CAB International [CD-ROM].

EPPO. 2006. PQR database (version 4.5). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. www.eppo.org.

Franco, J. 1979. Effect of temperature on hatching and multiplication of potato cyst-nematodes. Nematologica, 25(2): 237-244.

Gupta, J.C. and A.S. Atwal. 1971. Biology and ecology of *Hoplolaimus indicus* (Hoplolaiminae: Nematoda). I. The life stages and the feeding behaviour. Nematologica, 17: 69 -74.

Hunt, D.J. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae : their systematics and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. .

Nickle, W.R. 1991. Manual of agricultural nematology. M. Dekker, New York. U.S.A..

Siddiqi, M.R. 2000. Tylenchida: parasites of plants and insects. CABI Publications, Wallingford, UK.

Zuckerman, B. M., W. F. Mai and L R. Krusberg. 1990. Plant Nematode Laboratory Manual. The University of Massachusetts Agricultural Experiment Station Amherts. Massachusetts, U.S.A..

พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์กับส่วนขยายพันธุ์ของส้ม

Development of Viroid Detection on Citrus propagation

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1] กาญจนา วาระวิชะนี[1]
วันเพ็ญ ศรีชาติ[2] วานิช คำพานิช[2] ปรียพรรณ พงศาพิชญ์[2]
1/ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช[1]
2/ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช[2]

บทคัดย่อ

เชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายพืชกลุ่มส้มที่มีรายงานมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดเช่น *Citrus exocortis viroid* (CEVd) *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) *Citrus viroid* II (CVd-II) *Citrus viroid*-I-LSS (CVd-I-LSS) *Citrus viroid* III (CVd-III) *Citrus viroid* OS (CVd-OS) *Japanease citrus viroid* (JCVd) *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) ซึ่งไวรอยด์หลายชนิดถูกประกาศให้เป็นเป็นศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ต้องมีการตรวจวินิจฉัยส่วนขยายพันธุ์พืชที่นำเข้า แต่เนื่องจากไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิด และไม่มีโปรตีนห่อหุ้มเหมือนไวรัส ซึ่งไม่สามารถด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาได้ การนำใช้เทคนิคทางอณุชีววิทยา เช่น RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) เข้าช่วยในการตรวจจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม สำหรับการป้องกันการแพร่ระบาดและทำความเสียหายของโรค

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-04-01-01-51

คำนำ

ส้ม (Orange, *Citrus sinesis*) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง มีการปลูกกันแพร่หลายทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยด้วย โดยจังหวัดที่มีการปลูกมากได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แพร่ น่าน สุโขทัย กำแพงเพชร สระบุรี ปทุมธานี พิจิตร ลพบุรี สมุทรสงคราม ชุมพร และนครศรีธรรมราช เป็นต้น พืชสกุลส้มมีอยู่ 130 สกุล ประมาณ 1,500 ชนิด สามารถปลูกได้ในสภาพภูมิอากาศเขตกึ่งร้อน ตั้งแต่ซีกโลกเหนือ เขตเมดิเตอร์เรเนียน จนถึงซีกโลกใต้ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ ส้ม ส้มเขียวหวาน เลมอนและมะนาว เกรปฟรุตและส้มโอ และส้มอื่น ๆ

ส้มเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมบริโภคแพร่หลายทั่วโลกทั้งการบริโภคผลสด หรือนำมาผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น น้ำผลไม้ แยม ผลไม้เชื่อม สกัดน้ำมันเป็นน้ำมันหอมระเหย ใช้ในอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง ในปี พ.ศ. 2548 มีการนำเข้าผลส้มเข้ามาในปริมาณถึง 4,072 ตัน คิดเป็นมูลค่า 103.6 ล้านบาท และมีการส่งออกผลส้มในปริมาณ 12,939 ตัน คิดเป็นมูลค่า 248.8 ล้านบาท เนื่องจากส้มเป็นพืชที่มีโรคและแมลงศัตรูมากมายหลายชนิดด้วยกัน ประกอบกับประเทศไทยมีภูมิอากาศที่ร้อนชื้น ส่งเสริมให้โรคและแมลงศัตรูพืชสามารถเกิดและเข้าทำลายส้มได้ดี เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไวรอยด์ จากรายงานมีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชสกุลส้มมีประมาณ 9 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd) *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) *Citrus viroid* II (CVd-II) *Citrus viroid*-I-LSS (CVd-I-LSS) *Citrus viroid* III (CVd-III) *Citrus viroid* OS (CVd-OS) *Japanease citrus viroid* (JCVd) *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd)

โดยลักษณะอาการของโรคที่สำคัญในพืชสกุลส้ม เช่น เชื้อ CEVd จะก่อให้เกิดอาการเปลือกแตกที่ต้นตอ ต้นพืชมีอาการแคระแกน และทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง ในมะนาวจะมีอาการแผลเป็นจุดที่ใบ และใน citron จะมีอาการใบย่นและม้วนลงอย่างรุนแรง ใบแตกและเซลล์ตายเป็นแผลสีน้ำตาลที่ใต้เส้นใบและใบยอด โดยมีอาการแคระแกรนร่วม เชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคจากการใช้กิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค การปนเปื้อนเชื้อจากอุปกรณ์ทางเกษตรต่าง ๆ เข้าสู่บาดแผลของพืช dodder โดยสามารถทำความเสียหายให้กับการผลิตส้มได้สูงถึง 5,147 ดอนล่า ต่อ เฮคแตร์ ซึ่งหากเชื้อไวรอยด์เหล่านี้ติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ของพืชสกุลส้มอาจก่อให้เกิดความเสียหายกับการผลิตส้มและพืชชนิดอื่นในประเทศไทยได้ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมไม่ให้โรคศัตรูพืชติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ส้มที่นำเข้าจากต่างประเทศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการปกป้องภาคการเกษตรของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
2. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
3. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
6. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
7. Gel electrophoresis
8. Gel Documentation UV-transilluminator
9. พืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Citron มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และ Gynura
10. เอ็นไซม์ reverse transcriptase
11. เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase
12. 100 bp DNA Ladder
13. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen)
14. ชุด kit สกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit c
15. pGEM-T easy vector (Promega)

วิธีการ

1. **สำรวจโรคในสวนส้มและเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์**

สำรวจโรคในส้มในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และชัยนาท เก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์ คือมีลักษณะอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองซีด โค้งลง และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบ Citron (*Citrus medica*) และ Gynura ด้วยวิธีกล โดยการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 บดตัวอย่างพืช จากนั้นโรยผง carborundum ลงบนใบพืชทดสอบ และทาใบพืชทดสอบด้วยน้ำคั้นจากพืชตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืชทดสอบ คือ จะเกิดอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองซีด ยอดโค้งงอลง และมีอาการเซลล์ตาย

ที่บริเวณเส้นใบใน Citron ส่วนใน Gynura จะมีอาการใบย่น โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 1 - 2 เดือน หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ

2. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้มเพื่อออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้มจากฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และนำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้ม ทุก ๆ สายพันธุ์ที่มีรายงานมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อกลุ่มเชื้อไวรอยด์ดังกล่าว

3. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม

เปรียบเทียบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม โดยเปรียบเทียบจากคุณภาพของอาร์เอ็นเอของ Citron ที่สกัดได้ด้วยวิธีการ 4 วิธี ได้แก่ วิธี MacKenzie buffer (MacKenzie, D.J. *et. al*., 1997), วิธี RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), วิธี CTAB buffer (Jeffries and Tina, n.d.) และ วิธี MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพด้วยการตรวจสอบ *ndhB gene* (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ซึ่งเป็น housekeeping gene ในคลอโรพลาสต์ โดยเทคนิค RT-PCR ซึ่งวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีมีขั้นตอนดังนี้

3.1 วิธี MacKenzie buffer: บดใบ Citron 200 มิลลิกรัม ด้วย MacKenzie buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 2.5% PVP-40) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จนละเอียด เติม ß-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมสารละลาย Sarkosyl ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดของเหลวปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงบน QIAshredder™ column (QIAGEN) ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายที่ผ่าน QIAshredder™ column ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม ethanol (96-100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและดูดสารละลายผสมดังกล่าวลงบน RNeasy® mini spin column (QIAGEN) ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column เติม QIAGEN buffer RW1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube ใหม่เข้ากับ column จากนั้นเติม QIAGEN buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อ

นาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column เติม QIAGEN buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ประกอบ RNeasy® mini spin column เข้ากับหลอด micro centrifuge ใหม่ เติม RNase-free sterile water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยหยดลงบน filter โดยตรง บ่มนาน 2 นาที จากนั้นปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ

3.2 วิธี RNeasy Plant Mini Kit: บดใบ Citron 100 มิลลิกรัม ด้วย RLT buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มี ß-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จนกระทั่งตัวอย่างละเอียด นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวใสส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวใสส่วนบน 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ absolute alcohol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส 15 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

3.3 วิธี CTAB (Scottish Agricultural Science Agency): บดใบ Citron 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40 เติมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็นปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที และตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.4 วิธี MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ร่วมกับการใช้ chloroform: isoamyl alcohol: บดใบ Citron 200 มิลลิกรัม ด้วย MacKenzie buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate, 25 mM EDTA pH 8.0 และ2.5% PVP-40) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จนละเอียด เติม ß-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมสารละลาย Sarkosyl ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็นปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที และตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4. ตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR

4.1 นำตัวอย่างพืชกลุ่มส้ม และพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้

4.2 ตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 16 เส้น ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จะมีขนาดอยู่ในช่วงตั้งแต่ 300 ถึง 400 base pair โดยไพรเมอร์มีลำดับเบสดังต่อไปนี้

CEVd

c- CCG-GGG-ATC-CCT-GAA-GGA-CTT (21 bps) Tm = 61.4

h- GGA-AAC-CTG-GAG-GAA-GTC-GAG (21 bps) Tm = 57.9

CBLVd

c- GTC-GAC-GAC-GAC-CAG-TCA-GCT-CC (23 bps) Tm = 67.1

h- GAA-GGC-TCG-TCA-GCT-GCG-GAG-G (22 bps) Tm = 69.6

CVdI

c- CCG-AGG-AGC-CCT-CAG-GGG-TTC (21 bps) Tm = 65.8

h- AGA-CTT-CTT-GTG-GTT-CCT-GTG-GTG (24 bps) Tm = 62.7

CVdII

c- GGC-TCA-AGA-GAG-GAT-CCG-CGG (21 bps) Tm = 67.0

h- CCT-GGG-GAA-TTC-TCG-AGT-TGC-CG (23 bps) Tm = 66.4

CVdIII

c- GTC-GAC-GAC-GAC-AGG-TAA-GTT-CCC (24 bps) Tm = 64.4

h- GAA-GGC-AGC-TAA-GTT-GGT-GAC-GCC (24 bps) Tm = 66.7

CVdIV

c- TTC-CCC-GGG-GAT-CCC-TCT-TCA-GG (23 bps) Tm = 65.8

h- ATC-TCT-TCA-GAC-TCG-TCG-AGG-GG (23 bps) Tm = 65.3

CVdOS

c- TTA-CCC-TGG-GGA-CTC-CAC-CGC-CG (23 bps) Tm = 67.5

h- AAC-ACG-ATT-GGT-GTT-TCC-CCG-GAG-G (25 bps) Tm = 65.2

HSVd

c- TCG-GAA-GAG-CCA-GAA-GG (17 bps) Tm = 54.7

h- TGA-GAC-GCG-ACC-GGT-GGC-ATC-ACC-T (25 bps) Tm = 67.5

4.3 ขั้นตอนการทำ RT-PCR

4.3.1 ขั้นตอน Reverse Transcription (RT) เพื่อสร้างสาย cDNA จากเชื้อไวรอยด์ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย c	10.0	ไมโครลิตร
ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	3.5	ไมโครลิตร
รวม	13.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาเติมสารดังนี้

5X reverse transcriptase buffer	4.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2.0	ไมโครลิตร
200 U/μl reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร
รวม	6.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ ซึ่งในขั้นนี้จะได้ cDNA (Complement DNA) ที่สามารถนำมาเพิ่มปริมาณต่อได้โดยเทคนิค PCR ในขั้นตอนต่อไป

4.3.2 ขั้นตอน Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากพอที่จะตรวจสอบได้ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

50 mM $MgCl_2$	0.8	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.5	ไมโครลิตร
2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย c	2.0	ไมโครลิตร
2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย h	2.0	ไมโครลิตร
2 U/μl Taq DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	10.2	ไมโครลิตร
cDNA	2.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

สำหรับเชื้อ CEVd

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	56°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ CBLVd, CVdII, CVdIV และ CVdOS

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	64°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ CVdI

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	60°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ CVdIII

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	62°C	นาน 45 วินาที	

ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ HSVd

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	52°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

4.4 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิสโดยการใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

4.5 ทำการโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรอยด์ด้วย pGEM-T easy vector (Promega) และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

4.5.1 เตรียม cDNA ให้บริสุทธิ์ โดยการนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ โดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ คือมีขนาดประมาณ 370 คู่เบส ใส่หลอด centrifuge tube ชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัม

4.5.2 สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยเติมสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ QIAquick spin column วางบน collection tube ดูดสารละลายผสมใส่ใน ชุด column โดยดูดสารละลายไม่เกิน 800 ไมโครลิตร

นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งน้ำใสในหลอด collection tube ล้าง QIAquick spin column ด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง QIAquick spin column อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis หากได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จะต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ซ้ำอีกครั้งจนได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว

4.5.3 เชื่อมต่อ cDNA ของเชื้อไวรอยด์เข้ากับพลาสมิดพาหะ โดยเชื่อมต่อ cDNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
PCR product	8.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/μl)	1.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4.5.4 นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ DH 5α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch et al., 2001) โดยเติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ทำให้พร้อมรับพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ E. coli ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ แช่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหาร LB เดิมทิ้งและเติมอาหารเหลว LB ใหม่ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปแทน เพื่อละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ spread ผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) ความ

เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นนำสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย spread บนอาหารแข็ง LB agar ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อคัดเลือก colony ของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน cDNA ของเชื้อไวรอยด์

4.5.5 สกัดพลาสมิดลูกผสม ใช้วิธีการ Alkaline lysis (Fristchet al., 2001) โดยเลือกโคโลนีของเชื้อ E. coli ที่มีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเหลวออก เติมสารละลาย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture จากนั้นเติมสารละลาย Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200ไมโครลิตร ที่เตรียมใหม่ก่อนการใช้งาน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติมสารละลาย Solution III (3 M potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่บนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร สารละลาย ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายและตากตะกอนพลาสมิดให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร

4.5.6 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะ โดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ไปตัดโคลนของพลาสมิดลูกผสม เพื่อแยก cDNA ของไวรอยด์ออกจากพลาสมิดลูกผสม มีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	5.0 ไมโครลิตร
10X EcoRI buffer	1.0 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ EcoRI	0.3 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ RNase A	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	3.2 ไมโครลิตร
รวม	10.0 ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย 2% agarose gel electrophoresis นำโคลนของพลาสมิดลูกผสมที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 - 400 คู่เบสไปวิเคราะห์หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.5.7 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ หลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะและได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Automated DNA sequencer แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์ที่มีการรายงานอยู่แล้วในฐานข้อมูลของ GenBank โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด ในการจำแนกชนิดของไวรอยด์

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 ถึงกันยายน 2553 รวม 3 ปี

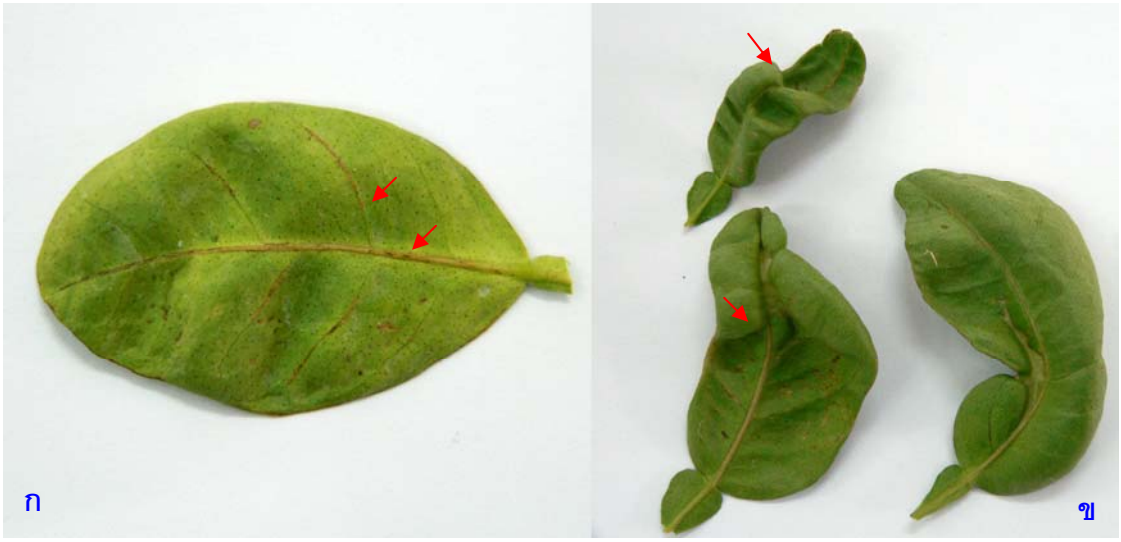
สถานที่วิจัย : 1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. สวนส้มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดราชบุรี นครปฐม ชัยนาท

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจโรคในสวนส้มและปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบ Citron และ Gynura

จากการสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างอาการในสวนส้มและมะนาวในพื้นที่จังหวัดราชบุรี นครปฐม ชัยนาท ได้ตัวอย่างใบมะนาวที่แสดงอาการโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์รวม 2 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะอาการใบเหลืองซีด หดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ และอาการใบบิดม้วน (**ภาพที่ 1**) ผลการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบไม่พบอาการผิดปกติบน Citron



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการบนตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรค

ก: อาการใบเหลืองซีด มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ

ข: อาการใบหดลดรูป และใบบิดม้วนก้านใบ

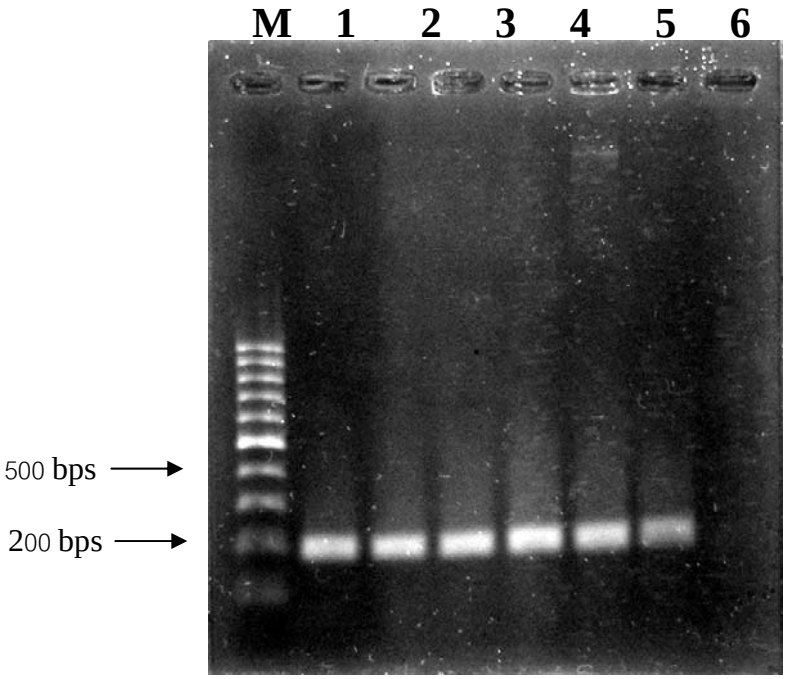
2. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศและออกแบบไพรเมอร์

จากการสืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้มจากฐานข้อมูล NCBI (http://www. ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่ามีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้ม 8 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus viroid* II (CVd-II) *Citrus viroid*-I-LSS (CVd-I-LSS), *Citrus viroid* III (CVd-III), *Citrus viroid* OS (CVd-OS) *Citrus viroid*-IV (CVd-IV) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) (Hadidi *et al*., 2003)

นำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้ม ทุก ๆ สายพันธุ์ที่มีรายงานจากฐานข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อกลุ่มเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 16 เส้น

3. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม

ผลการตรวจเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีการ ได้แก่ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit, CTAB buffer และ MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ พบว่าทั้ง 4 วิธีการสามารถสกัดอาร์เอ็นเอจากใบ Citron ได้ทั้งหมด เมื่อนำมาตรวจสอบหา *ndhB gene* (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ด้วยเทคนิค RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 bp (**ภาพที่ 2**) แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดีทั้ง 4 วิธีการ ยกเว้นวิธีการ MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ พบว่าตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้จะปริมาณแป้งค่อนข้างมากซึ่งอาจส่งผลรบกวนต่อปฏิกิริยา RT-PCR ได้ และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหลืออีก 3 วิธี พบว่า วิธีการ MacKenzie buffer และ RNeasy Plant Mini Kit มีความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงานสูงสุด โดยใช้เวลาในการสกัดอาร์เอ็นเอเพียงครึ่งวันเท่านั้น แต่จำเป็นต้องใช้สารเคมีและชุดสกัดอาร์เอ็นเอที่มีราคาสูงมาก ส่วนวิธี CTAB buffer จะใช้เวลาในการสกัดอาร์เอ็นเอถึงหนึ่งวันครึ่ง แต่สารเคมีที่ใช้จะมีราคาที่ถูกกว่ามาก ซึ่งวิธี CTAB buffer น่าจะมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ในส้มได้ เนื่องจากได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดี และมี unit cost ต่อหน่วยต่ำที่สุด



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี โดยการตรวจสอบ *ndhB gene*

M = 100 bps DNA Ladder

1 = MacKenzie buffer,

2 และ 3 = CTAB buffer

4 = RNeasy Plant Mini Kit

5 และ 6 = MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์

7 = buffer

RT-PCR

ทดสอบหาเชื้อ *Citrus exocortis viroid Citrus bent leaf viroid* และ *Hop stunt viroid* ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างอาการที่นำมาตรวจสอบทั้งหมดมาจากแหล่งพื้นที่ปลูกเพียง 4 แหล่ง ซึ่งอาจไม่ได้เป็นสวนที่มีการแพร่ระบาดของโรค

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองในขั้นแรกพบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อส้มมี 3 วิธี ได้แก่ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit และ CTAB buffer โดยทั้ง 3 วิธีให้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง แต่วิธี MacKenzie buffer และ RNeasy Plant Mini Kit มี unit cost ที่สูงกว่าวิธี CTAB buffer มาก

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่สนใจ อาจเนื่องจากไม่พบตัวอย่างที่เป็นโรค เพราะจำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจมาจากแหล่งผลิตส้มเพียงไม่กี่แหล่งปลูก อันเนื่องมาจากการทดลองนี้ไม่ได้รับเงินวิจัยสนับสนุนในปีที่ 3 (ปีงบประมาณ 2553) ทำให้ไม่สามารถดำเนินการสำรวจโรคเพื่อเก็บตัวอย่างได้ และไม่สามารถจัดซื้อสารเคมีที่จำเป็นสำหรับทำการตรวจสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลได้

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากเงินสนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้ได้รับการจัดสรรช้า คือได้รับช่วงไตรมาสที่สาม ต้นเดือนเมษายน และยังได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ของที่เสนอขอไว้ ส่งผลทำให้การดำเนินการทดลองไม่เป็นไปตามแผนการทดลองที่ได้วางแผนไว้ ซึ่งเป็นอุปสรรคใหญ่ที่ทำให้งานทดลองนี้ไม่สามารถดำเนินการทดลองเสร็จสิ้นตามเป้าหมายได้

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คนึงนิตย์ เหรียญวรากร ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ ที่ช่วยปลูกและดูแลพืชทดสอบให้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

สมบูรณ์ พรหมมา. 2545. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในมะนาว. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Asai M., T. Ohara, T. Takahashi, S. Saito and K. Tanaka. 1998. Detection of viroids in fruit trees by return gel electrophoresis. **Research Bulletin of the Plant Protection Service**. Japan. 34: 99-102.

Fagoaga, C. and N. Duran-Vila. 1996. Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetable crops. **Plant Pathology**. 45(1): 45-53.

Hataya, T. 1997. Characteristics and detection methods of viroids detected from citrus in Japan. **Shokubutsu Buick**. 51, 163-167.

Hataya, T., K. Nakahara, T. Ohara, H. Leki and T. Kano. 1998. Citrus viroid I is a derivative of *Citrus bent leaf viroid* (CVd-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. **Arch. Virol**. 143, 971-80.

Hoshino, T., T. Hayata and T. Ohara. 2000. Cachexia pathogenicity of *Hop stunt viroid* isolates. Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 66, 143. (Abstract in Japanese)

Ito, T., and H. Ieki. 1996. Detection of Citrus exocortis viroid and Citrus viroid I, II, III, IV by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 62, 614-615. (Abstract in Japanese)

Ito, T. 1999. Pathogenicity and diagnosis of citrus viroid, and their distribution in Japan. **Shokubutsu Buick**. 53, 347-350.

Ito, T. 2000. Viroid disease of fruit trees in Japan. **PSJ Plant Virus Dis**. Rept. 5, 28-39.

Ito, T., H. Ieki and K. Ozaki. 2000 a. A population of variants of a viroid closely related to Citrus viroid-I in citrus plants. **Arch. Virol**. 145, 2105-2114.

Ito, T., T. Ito and M. Isaka. 2000 b. Viroid with reported nucleotide sequence of *Citrus cachexia viroid* or its characteristic nucleotide changes, detected from introduced citrus trees in Japan. Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 66, 143. (Abstract in Japanese)

Levy L., A. Hadidi and S.M. Garnsey. 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiple primer sets. **Proceedings International Society Citriculture**. Vol. 2, 800-803.

Nakahara, K., T. Hataya, I. Uyeda and H. Ieki. 1998. An improved procedure for extracting nucleic acids from citrus tissues for diagnosis of citrus viroids. Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 64, 532-538.

Sano, T., T. Hayata, A. Sasaki and E. Shikata. 1986. Etrog citron is latently infected with Hop stunt viroid-like RNA. **Proc. Japan Acad**. 62, 325-328.

Semancik J.S., L.K. Grill and E.L. Civerolo. 1978. Accumulation of viroid RNA in tumor cells after double infection by *Agrobacterium tumefaciens* and *Citrus exocortis viroid*. **Phytopathology**. 68(12): 1728-1732.

Tanaka, H. and S. Yamada. 1971. Occurrence of citrus exocortis in Japan – Survey from 1963 to 1971. **Bull. Hortic. Res. Sta**. 11, 149-154.

Weathers L.G. 1965. Transmission of exocortis virus of citrus by *Cuscuta sublinclusa*. **Plant Disease Reporter**. 49: 189-190.

วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยเพื่อการส่งออก

สลักจิต พานคำ อุดร อุณหวุฒิ รัชฎา อินทรกำแหง ชัยณรัตน์ สนศิริ
มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชุติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จำนวนมากด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ในจำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยใส่ไข่ และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 10 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลลำไยโดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ) และในการอบผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ) แสดงให้เห็นว่าในระยะไข่มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะหนอนวัยที่ 1

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-04

คำนำ

ลำไยเป็นหนึ่งในผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ ได้แก่ แมลงวันทอง, Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), (Diptera : Tephritidae) (White and Elson-Harris, 1992) ด้วยเหตุนี้ผลลำไยจากประเทศไทยจึงถูกห้ามนำเข้าประเทศญี่ปุ่น ซึ่งไม่มีแมลงชนิดดังกล่าวนี้แพร่ระบาด ภายใต้ข้อกำหนดของกฎหมายกักกันพืช ข้อกำหนดนี้จะถูกยกเลิกไปหากประเทศไทยสามารถพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) เพื่อใช้สำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลลำไยก่อนการส่งออก

ในปี พ.ศ. 2529 กรมวิชาการเกษตรโดยความช่วยเหลือด้านวิชาการจากรัฐบาลญี่ปุ่น ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ความร้อนกำจัดแมลงวันทอง และแมลงวันแตง, Melon fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett, ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน ผลการศึกษาพบว่า วิธีการอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน และได้ตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Unhawutti et al., 1986) และต่อมาในปี พ.ศ. 2534 ได้มีการวิจัย และพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยกรรมวิธีใหม่ คือ วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) ที่มีประสิทธิภาพสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงครอบคลุมถึง 4 พันธุ์ คือ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลมะม่วง (Unhawutti et al., 1991) หน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่นยอมรับให้ใช้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงก่อนการส่งออก ต่อมาจึงมีการสร้างโรงงานกำจัดแมลงด้วยความร้อนขนาดใหญ่ระดับการค้า วิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีซึ่งอาศัยอากาศเป็นสื่อนำความร้อน ได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางในหลายประเทศสามารถกำจัดแมลงวันทองในผลไม้ได้หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังมีข้อดีในแง่ของความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลไม้ จึงผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้าหากมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง ซึ่งลำไยเป็นผลไม้ที่มีปัญหาการส่งออกเกี่ยวข้องกับแมลงวันผลไม้

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพ และเป็นที่ยอมรับสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไย ด้วยเหตุนี้ความพยายามที่จะขยายตลาดการส่งออกไปยังประเทศที่ห้ามนำเข้าผลลำไยสดจากประเทศไทย จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาเบื้องต้นวิธีกำจัดแมลงวันทองในระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำซึ่งใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับผลลำไย นอกจากนี้ยังจำเป็นที่จะต้องศึกษาถึงความเสียหายและคุณภาพของผลลำไยจากวิธีการอบไอน้ำ

ด้วยเพื่อวิจัย และพัฒนาให้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยก่อนการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง 2 เครื่อง
2. ตู้ลดอุณหภูมิผลไม้
3. ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ 2 ห้อง
4. เครื่องอ่างน้ำร้อน
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดของผลไม้
6. เครื่องวัดค่าความหวานของผลไม้
7. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก โดยใช้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก 3 ตู้
9. ห้องเย็นสำหรับเก็บผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง
10. เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์แบบต่อเนื่อง
11. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
13. อุปกรณ์สำหรับเช็คผลการทดลอง ๆ ได้แก่ พู่กัน ปากคีบ เคาท์เตอร์ จานทดลองขนาดเล็ก (plate) ถาดใส่ผลไม้ ถุงผ้าตาข่าย ถุงมือ มีดปอกผลไม้ ถุงขยะดำ และอื่น ๆ

ขั้นตอนการดำเนินงานมีดังนี้

1. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณและเพื่อใช้ในการทดลอง
2. ศึกษาเบื้องต้นการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ
3. ศึกษาด้านความเสียหายและคุณภาพของผลลำไยจากวิธีการอบไอน้ำ
4. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง

<u>1.1 แมลงที่ใช้ในการทดลอง</u> : ทำการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นจำนวนมากไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของกลุ่มกำจัดศัตรูพืช

กักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยสภาพของห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5 x 4.6 x 2.3 ม. อุณหภูมิ 25-27 $^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดชีวภาพ (bioluck) จำนวน 20 หลอด ซึ่งได้ติดตั้งไว้บนเพดานห้อง และอีกจำนวน 40 หลอดติดตั้งไว้บนผนังรอบห้อง โดยไฟจะสว่างในระหว่างช่วงเวลา 6.00 น – 18.00 น. และติดตั้งหลอดฟลูโอเรทเซ็นขนาด 40 วัตต์ อีก 1 หลอด เพื่อให้แสงสลัวเลียนแบบสภาพของแสงแดดในช่วงรุ่งเช้า และพลบค่ำซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผสมพันธุ์ของแมลง โดยไฟจะเปิดและปิดในช่วงเวลา 5.30-6.00 น. และ 18.00-18.30 น. สำหรับต้นกำเนิดสายพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ได้มาจากผลน้อยหน่าเก็บรวบรวมในท้องที่อำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา แมลงตัวเต็มวัยจะถูกจำแนกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet)

1.2 หลักปฏิบัติในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ : เลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจำนวนมากประมาณ 20,000 ตัว ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 65.5 x 69 x 77 ซม. กรงแมลงทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมซ ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน enzymatic protein hydrolysate (Amber series 100) 1 ส่วน และ yeast extract 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาด 6 x 7.5 ซม. ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มม. จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยครบ 7 สัปดาห์ ทำลายแมลงที่ยังหลงเหลืออยู่ในกรงทั้งหมด ทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นใหม่ต่อไป ระหว่างการทดลองเตรียมแมลงตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันไว้ไม่น้อยกว่า 5 กรง มีแมลงมากกว่า 100,000 ตัว

1.3 การควบคุมคุณภาพของแมลงวันผลไม้ : แมลงวันผลไม้ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรงเพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ เพื่อที่จะสามารถพบสิ่งผิดปกติและแก้ไขได้ทันที โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักของไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

2. ศึกษาเบื้องต้นการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ

การศึกษา เบื้องต้นการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ 2 วิธีการ คือ 1.วิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) และ 2.วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model : EHK-10000, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง ซึ่งได้ผ่านการปรับปรุงเครื่องเมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2549 สำหรับลำไยที่ใช้ในการทดลอง คือ พันธุ์อีดอ ทำการอบลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ 2 วิธีการ โดยขั้นตอนของการตั้งรูปแบบ (pattern) ของวิธีการอบไอน้ำ 2 วิธีการ ทำได้โดยการใส่ค่าของอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ให้สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่เหมาะสมกับลำไยเข้าไปที่เครื่องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นซึ่งติดตั้งไว้เพื่อควบคุมระบบการเดินเครื่องของตู้อบไอน้ำ สำหรับวิธีการอบไอน้ำ VHT การผ่านความร้อนของลำไยจะอยู่ภายใต้สภาพอากาศร้อนความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ตลอดเวลา ในขณะที่วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์นั้น ในช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลลำไยถึง 43 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศเป็น 50, 65 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นความชื้นสัมพัทธ์จะถูกปรับเปลี่ยนให้เพิ่มสูงขึ้นอยู่ที่ระดับ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยการวัดอุณหภูมิผลลำไยที่ทดลองอาศัยการวัดจากตัวแทนลำไยทั้งตู้กำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) มีน้ำหนัก 12.00 - 13.00 กรัม/ผล เมื่ออบลำไย ครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้โดยให้อุณหภูมิภายในสุดผลลิ้นจี่คงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 10, 20.30, 40 และ 50 นาที ตามลำดับ
ต่อจากนั้นนำลำไยที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำ และทำการลดอุณหภูมิผลลำไยทันทีในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model : SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) หลังจากนั้นตรวจผลจากเครื่องบันทึกข้อมูล

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น กันยายน 2549 **สิ้นสุด** ตุลาคม 2555 **รวม** 5 **ปี**
โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา 5 ปี ปีที่เสนอขอเป็นปีที่ 2

สถานที่

จังหวัดระยอง จันทบุรี ตราด ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ขอนแก่น สกลนคร กาฬสินธุ์ มหาสารคาม นครราชสีมา สุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จำนวนมากด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ในจำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยใส่ไข่ และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 10 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลลำไยโดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ) และในการอบผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ) แสดงให้เห็นว่าในระยะไข่มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะหนอนวัยที่ 1

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. ได้ไข่และหนอนของแมลงวันผลไม้จำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานทดลอง

2. การศึกษาเบื้องต้นวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยใส่ไข่ และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 10 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลลำไยโดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ) และในการอบผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ) แสดงให้เห็นว่าในระยะไข่มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะหนอนวัยที่ 1

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณอนุกูล อ้วนเส้ง คุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม คุณมีนา จริงจิตร คุณกัลยา วงศ์สุวรรณ คุณประชุม นุ้ยจำนัล และคุณพิสมัย งามผิวเหลืองที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลอง รวมถึงการเช็คผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, *Mangifera indica* Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, D. *cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 108 p.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisoon and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang Klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes infested with fruit flies (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 342 p.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance : Their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 p.

วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลิ้นจี่เพื่อการส่งออก

รัชฎา อินทรกำแหง อุดร อุณหวุฒิ สลักจิต พานคำ วลัยกร รัตนเดชากุล
วรัญญา มาลี ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์
ชุติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จำนวนมากด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ในจำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนวัยที่ 1 และ 2 ในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยวิธีการ ใส่ไข่ และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 10 ฟอง/ตัว ต่อผล และหนอนวัยที่ 2 จำนวน 5 ตัวต่อผล เข้าไปในผลลิ้นจี่โดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยไข่ หนอนวัยที่ 1 และ 2 ได้โดยทั้ง 3 ระยะมีอัตรการตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 1 ซ้ำ)

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-05

คำนำ

ลิ้นจี่เป็นหนึ่งในผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ ได้แก่ แมลงวันทอง, Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), (Diptera : Tephritidae) (White and Elson-Harris, 1992) ด้วยเหตุนี้ ลิ้นจี่จากประเทศไทยจึงถูกห้ามนำเข้าประเทศญี่ปุ่น ซึ่งไม่มีแมลงชนิดดังกล่าวนี้แพร่ระบาดภายใต้ข้อกำหนดของกฎหมายกักกันพืช ข้อกำหนดนี้จะถูกยกเลิกไปหากประเทศไทยสามารถพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ได้ตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) เพื่อใช้สำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลลิ้นจี่ก่อนการส่งออก

ในปี พ.ศ. 2529 กรมวิชาการเกษตรโดยความช่วยเหลือทางด้านวิชาการจากรัฐบาลญี่ปุ่นได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ความร้อนกำจัดแมลงวันทอง และแมลงวันแตง, Melon fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน ผลการศึกษาพบว่า วิธีการอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน และได้ตามมาตรฐานของวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Unhawutti et al., 1986) และต่อมา ในปี พ.ศ. 2534 ได้มีการวิจัย และพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยกรรมวิธีใหม่ คือ วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heattreatment, MVHT) ที่มีประสิทธิภาพสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงครอบคลุมถึง 4 พันธุ์ คือ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลมะม่วง (Unhawutti et al., 1991) หน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่นยอมรับให้ใช้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืชเพื่อกำจัดแมลงวันทองในผลลิ้นจี่ก่อนการส่งออก ต่อมาจึงมีการสร้างโรงงานกำจัดแมลงด้วยความร้อนขนาดใหญ่ระดับการค้า วิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีซึ่งอาศัยอากาศเป็นสื่อนำความร้อน ได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางในหลายประเทศว่าสามารถกำจัดแมลงวันทองในผลไม้ได้หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังมีข้อดีในแง่ของความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลไม้ จึงผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้าหากมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง ซึ่งลิ้นจี่เป็นผลไม้ที่มีปัญหาการส่งออกเกี่ยวข้องกับแมลงวันทอง

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพ และเป็นที่ยอมรับสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลิ้นจี่ ด้วยเหตุนี้ความพยายามที่จะขยายตลาดการส่งออกไปยังประเทศที่ห้ามนำเข้าผลลิ้นจี่สดจากประเทศไทย จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพิสูจน์สถานภาพการเป็นพืชอาศัย และการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ในผลลิ้นจี่ และศึกษาเบื้องต้นวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำซึ่งใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับผลลิ้นจี่ นอกจากนี้ยัง

จำเป็นต้องศึกษาถึงความเสียหาย และคุณภาพของผลลิ้นจี่จากวิธีการอบไอน้ำด้วย เพื่อวิจัย และพัฒนาให้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลลิ้นจี่ก่อนการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง 2 เครื่อง
2. ตู้ลดอุณหภูมิผลไม้
3. ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ 2 ห้อง
4. เครื่องอ่างน้ำร้อน
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดของผลไม้
6. เครื่องวัดค่าความหวานของผลไม้
7. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก โดยใช้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก 3 ตู้
9. ห้องเย็นสำหรับเก็บผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง
10. เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์แบบต่อเนื่อง
11. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
13. อุปกรณ์สำหรับเช็คผลการทดลอง ๆ ได้แก่ พู่กัน ปากคีบ เคาท์เตอร์ จานทดลองขนาดเล็ก(plate) ถาดใส่ผลไม้ ถุงผ้าตาข่าย ถุงมือ มีดปอกผลไม้ ถุงขยะดำ และอื่น ๆ

ขั้นตอนการดำเนินงานมีดังนี้

1. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณและเพื่อใช้ในการทดลอง
2. ศึกษาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำ
3. ศึกษาเบื้องต้นวิธีกำจัดแมลงวันทองในระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำ
4. ศึกษาความเสียหายและคุณภาพของผลลิ้นจี่จากวิธีการอบไอน้ำ
5. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง

<u>1.1 แมลงที่ใช้ในการทดลอง</u> : ทำการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นจำนวนมากไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของกลุ่มกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยสภาพของห้องเลี้ยงแมลงวันทองเป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5 x 4.6 x 2.3 ม. อุณหภูมิ 25-27 $^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดชีวภาพ (bioluck) จำนวน 20 หลอด ซึ่งได้ติดตั้งไว้บนเพดานห้องและอีกจำนวน 40 หลอดติดตั้งไว้บนผนังรอบห้อง โดยไฟจะสว่างในระหว่างช่วงเวลา 6.00 น – 18.00 น. และติดตั้งหลอดฟลูโอเรทเซ็นขนาด 40 วัตต์ อีก 1 หลอด เพื่อให้แสงสลัวเลียนแบบสภาพของแสงแดดในช่วงรุ่งเช้า และพลบค่ำซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผสมพันธุ์ของแมลง โดยไฟจะเปิดและปิดในช่วงเวลา 5.30 - 6.00 น. และ 18.00-18.30 น. สำหรับต้นกำเนิดสายพันธุ์ของแมลงวันทองได้มาจากผลน้อยหน่าเก็บรวบรวมในท้องที่อำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา แมลงตัวเต็มวัยจะถูกจำแนกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันทอง *B. dorsalis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำแมลงวันทองตัวเต็มวัยไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet)

<u>1.2 หลักปฏิบัติในการเลี้ยงแมลงวันทอง</u> : เลี้ยงแมลงทองตัวเต็มวัยจำนวนมากประมาณ 20,000 ตัว ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 65.5 x 69 x 77 ซม. กรงแมลงทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมซ ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน enzymatic protein hydrolysate (Amber series 100) 1 ส่วน และ yeast extract 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาด 6 x 7.5 ซม. ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มม. จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยครบ 7 สัปดาห์ ทำลายแมลงที่ยังหลงเหลืออยู่ในกรงทั้งหมด ทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นใหม่ต่อไป ระหว่างการทดลองเตรียมแมลงตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันไว้ไม่น้อยกว่า 5 กรง มีแมลงมากกว่า 100,000 ตัว

<u>1.3 การควบคุมคุณภาพของแมลงวันทอง</u> : แมลงวันทองซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรงเพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ เพื่อที่จะสามารถพบสิ่งผิดปกติและแก้ไขได้ทันที โดย

ในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักของไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

2. ศึกษาเบื้องต้นวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำ

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องอบไอน้ำ “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model : EHK-1000B, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง ลิ้นจี่ที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 13.50-16.50 กรัม/ผล แมลงวันทองระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง และหนอนวัยที่ 1 ได้จากแมลงวันทองตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้เป็นจำนวนมากในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียม (artificial diet) สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al., 1973) โดยใส่ไข่และหนอนวัยที่ 1 จำนวนอย่างละ 10 ฟอง/ ตัว ต่อผล และหนอนวัย 2 จำนวน 5 ตัวต่อผล ทำการอบลิ้นจี่ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลลิ้นจี่ขึ้นถึง 43 ° ซ. อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงควรปรับเปลี่ยนเป็นอากาศร้อนที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยอบลิ้นจี่ให้อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 46 องศาเซลเซียส และคงความร้อนภายในผลไว้ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55 และ 60 นาที การวัดอุณหภูมิผลลิ้นจี่ที่ทดลองอาศัยการวัดจากลิ้นจี่กำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) มีน้ำหนัก 14.50-14.70 กรัม/ผล เมื่ออบลิ้นจี่ ครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้ นำลิ้นจี่ที่ผ่านความร้อนออกจากเครื่องตู้อบความร้อน และทำการลดอุณหภูมิผลลิ้นจี่ทันทีโดยการเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model : SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จากนั้นบันทึกผลการทดลองหลังจากอบลิ้นจี่ 7 วัน ทำการบันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแมลงด้วยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น กันยายน 2549 **สิ้นสุด** ตุลาคม 2553 **รวม** 5 **ปี**

โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา 5 ปี ปีที่เสนอขอเป็นปีที่ 5

สถานที่

จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย พะเยา สมุทรสาคร และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จำนวนมากด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ในจำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยวิธีการใส่ไข่ และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 10 ฟอง/ ตัว ต่อผล และหนอนวัยที่ 2 และ3 จำนวน 5 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลลิ้นจี่โดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 2 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และในช่วงเวลานาน 45 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ และหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. ได้ไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้จำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานทดลอง
2. การศึกษาเบื้องต้นวิธีการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลลำไยด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนวัยที่ 1 และ 2 ในผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) โดยวิธีการใส่ไข่ และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 10 ฟอง/ตัว ต่อผล และหนอนวัยที่ 2 จำนวน 5 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลลิ้นจี่โดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลลิ้นจี่ด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยไข่ หนอนวัยที่ 1 และ 2 ได้ โดยทั้ง 3 ระยะมีอัตรการตายเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 1 ซ้ำ)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณนวลนิสา ตั้งสัจจะกุล คุณอนุกูล อ้วนเส้ง คุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม คุณมีนา จริงจิตร คุณกัลยา วงศ์สุวรรณ คุณประชุม นุ้ยจำนัล และคุณพิสมัย งามผิวเหลืองที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลอง รวมถึงการเช็คผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, *Mangifera indica* Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, D. *cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 108 p.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisoon and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang Klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes infested with fruit flies (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 342 p.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance : Their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 p.

วิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในมะม่วงพันธุ์มหาชนก โชคอนันต์ และเขียวเสวยเพื่อการส่งออก

รัชฎา อินทรกำแหง อุดร อุณหวุฒิ สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ
มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชุติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *Bactrocera. dorsalis* ระยะหนอนวัยที่ 1 ซึ่งเป็นระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในผลมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย มหาชนก และ โชคอนันต์ เปรียบเทียบกับพันธุ์หนังกลางวัน ด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) โดยการใส่หนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 100 ตัว/ผล เข้าไปในผลมะม่วงโดยตรง (artificial inoculation) แล้วนำไปอบไอน้ำพร้อมกับมะม่วงหนังกลางวันที่อุณหภูมิ 46.0 °ซ, 46.5 °ซ, 47.0 °ซ, 47.0 °ซ นาน 5 นาที, 47. °ซ นาน 10 นาที ผลการทดลองพบว่าหนอนวัยที่ 1 ในมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ทนทานต่อความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำ MVHT มากที่สุด โดยที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หนอนวัย 1 ในมะม่วงมหาชนก เขียวเสวย และหนังกลางวันมีเปอร์เซ็นต์การตาย (corrected mortality) 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ในมะม่วงโชคอนันต์มีเปอร์เซ็นต์การตาย 97.23 เปอร์เซ็นต์

จากผลจากการทดลองดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาเบื้องต้นประสิทธิภาพของวิธีการอบไอ-น้ำ MVHT เพื่อกำจัดหนอนวัยแมลงวันผลไม้ระยะที่ 1 ในมะม่วงโชคอนันต์ โดยทำการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 45.0 °ซ, 46 °ซ, 47.0 °ซ, 47.0 °ซ นาน 10 นาที, 15 นาที และ 20 นาทีพบว่าที่อุณหภูมิ 47.0 °ซ นาน 20 นาที สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ระยะที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการศึกษาประเมินประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำ MVHT ในการกำจัดแมลงวันผลไม้จำนวนมาก (2,000 ตัว) ในมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยการอบไอน้ำ MVHT ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 15, 20 และ 25 นาที (ผลการทดลองจาก 1 ซ้ำ) พบว่า ทุกวิธีการมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-06

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ผลิตมะม่วงได้หลายพันธุ์ โดยแต่ละพันธุ์มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันไปถึงแม้การส่งออกจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปีแต่เป็นจำนวนไม่มากนัก ดังนั้นการส่งเสริมมะม่วงพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อการส่งออกจัดเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มปริมาณการส่งออกและเปิดตลาดให้ได้มากขึ้น มะม่วงพันธุ์มหาชนก เขียวเสวย และโชคอนันต์เป็นอีกพันธุ์หนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในประเทศไทย สามารถรับประทานได้ทั้งมะม่วงดิบ และมะม่วงสุก อีกทั้งยังมีเปลือกที่ค่อนข้างหนา เนื้อแน่น และทนทานต่อโรค จึงเหมาะสมที่จะส่งเสริมให้มีการส่งออก โดยทั่วไปตลาดมะม่วงของประเทศไทยได้แก่ มาเลเซีย สิงค์โปร์ ฮ่องกง และสหภาพยุโรป เป็นตลาดที่ไม่มีปัญหาทางด้านกักกันพืชสามารถส่งออกมะม่วงพันธุ์ใหม่ ๆ ไปจำหน่ายได้ แต่ถ้าในอนาคตประเทศไทยต้องการที่จะเปิดตลาดไปยังบางประเทศที่มีศักยภาพในการซื้อสูงเช่น ญี่ปุ่น สหรัฐอมเริกา และเกาหลี ซึ่งเป็นประเทศที่มีความเข้มงวดทางด้านกฎหมายกักกันพืชในเรื่องของแมลงวันทอง จำเป็นต้องทำการกำจัดให้ได้ก่อนการส่งออกจึงจะผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้า

ในปี พ.ศ. 2529 กรมวิชาการเกษตรโดยความช่วยเหลือด้านวิชาการจากรัฐบาลญี่ปุ่น ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ความร้อนกำจัดแมลงวันทอง และแมลงวันแตงในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน ผลการศึกษาพบว่า วิธีการอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน โดยที่ได้ตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Unhawutti et al., 1986) ต่อมาในปี พ.ศ. 2534 ได้มีการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยกรรมวิธีใหม่ คือ วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) มีประสิทธิภาพสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงครอบคลุมถึง 4 พันธุ์ คือ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด พิมเสนแดง (Unhawutti et al., 1991) และล่าสุดพันธุ์มหาชนก (รัชฎา และคณะ., 2549) โดยที่วิธีการดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลมะม่วง

การใช้วิธีการอบไอน้ำเป็นวิธีการทางด้านกักกันพืช โดยในแต่ละประเทศจะใช้หลักการเดียวกัน คือการเพิ่มความร้อนให้กับพืชจนถึงระดับที่สามารถกำจัดแมลงได้เป็นที่ยอมรับทางกักกันพืช (probit 9) และต้องไม่ทำให้คุณภาพของผลไม้เสียหาย อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในเครื่องอบไอน้ำจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของผลไม้และแมลงที่ต้องการกำจัด นอกจากนี้วิธีการอบไอน้ำยังมีข้อดีในแง่ของความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลไม้ ด้วยเหตุนี้ความพยายามที่จะขยายตลาดการส่งออกมะม่วงจากประเทศไทยพันธุ์อื่น ๆ ที่น่าสนใจไปยังประเทศที่เข้มงวดทางด้านกฎหมายกักกันพืช จึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีกำจัด

แมลงด้วยความร้อนซึ่งใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ และเขียวเสวยเพื่อวิจัยและพัฒนาให้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ และเขียวเสวยก่อนการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง 2 เครื่อง
2. ตู้ลดอุณหภูมิผลไม้
3. ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ 2 ห้อง
4. เครื่องอ่างน้ำร้อน
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดของผลไม้
6. เครื่องวัดค่าความหวานของผลไม้
7. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก โดยใช้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก 3 ตู้
9. ห้องเย็นสำหรับเก็บผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง
10. เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์แบบต่อเนื่อง
11. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
13. อุปกรณ์สำหรับเช็คผลการทดลอง ๆ ได้แก่ พู่กัน ปากคีบ เคาท์เตอร์ จานทดลองขนาดเล็ก(plate) ถาดใส่ผลไม้ ถุงผ้าตาข่าย ถุงมือ มีดปอกผลไม้ ถุงขยะดำ และอื่น ๆ

ขั้นตอนการดำเนินงานมีดังนี้

1. เลี้ยงแมลงวันทองจำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณและเพื่อใช้ในการทดลอง
2. ศึกษาระยะการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของแมลงวันทองในมะม่วงเขียวเสวย
3. ศึกษาความทนทานต่อความร้อนของหนอนแมลงวันทองวัย1 ในมะม่วงพันธุ์มหาชนก โชคอนันต์ และเขียวเสวย
4. ศึกษาด้านความเสียหายและคุณภาพของผลมะม่วงพันธุ์เขียวเสวยจากวิธีการอบไอน้ำ
5. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงแมลงวันทองจำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง

1.1 แมลงที่ใช้ในการทดลอง : ทำการเลี้ยงแมลงวันทอง *B. dorsalis* เป็นจำนวนมากไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของกลุ่มกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยสภาพของห้องเลี้ยงแมลงวันทองเป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5 x 4.6 x 2.3 ม. อุณหภูมิ 25-27 $^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดชีวภาพ (bioluck) จำนวน 20 หลอด ซึ่งได้ติดตั้งไว้บนเพดานห้องและอีกจำนวน 40 หลอดติดตั้งไว้บนผนังรอบห้อง โดยไฟจะสว่างในระหว่างช่วงเวลา 6.00 น – 18.00 น. และติดตั้งหลอดฟลูโอเรทเซ็นขนาด 40 วัตต์ อีก 1 หลอด เพื่อให้แสงสลัวเลียนแบบสภาพของแสงแดดในช่วงรุ่งเช้า และพลบค่ำซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผสมพันธุ์ของแมลง โดยไฟจะเปิดและปิดในช่วงเวลา 5.30-6.00 น. และ 18.00-18.30 น. สำหรับต้นกำเนิดสายพันธุ์ของแมลงวันทองได้มาจากผลน้อยหน่าเก็บรวบรวมในท้องที่อำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา แมลงตัวเต็มวัยจะถูกจำแนกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันทอง *B. dorsalis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำแมลงวันทองตัวเต็มวัยไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet)

1.2 หลักปฏิบัติในการเลี้ยงแมลงวันทอง : เลี้ยงแมลงทองตัวเต็มวัยจำนวนมากประมาณ 20,000 ตัว ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 65.5 x 69 x 77 ซม. กรงแมลงทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมซ ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน enzymatic protein hydrolysate (Amber series 100) 1 ส่วน และ yeast extract 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาด 6 x 7.5 ซม. ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มม. จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยครบ 7 สัปดาห์ ทำลายแมลงที่ยังหลงเหลืออยู่ในกรงทั้งหมด ทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นใหม่ต่อไป ระหว่างการทดลองเตรียมแมลงตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันไว้ไม่น้อยกว่า 5 กรง มีแมลงมากกว่า 100,000 ตัว

1.3 การควบคุมคุณภาพของแมลงวันทอง : แมลงวันทองซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรงเพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ เพื่อที่จะสามารถพบสิ่งผิดปกติและแก้ไขได้

ทันที โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักของไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

2. ศึกษาเบื้องต้นประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำ MVHT ในการกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้ วัย 1 ในมะม่วงโชคอนันต์

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องอบไอน้ำ “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model : EHK-1000B, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่ใช้ในการทดลองมี ขนาดกลาง น้ำหนัก 300-360 กรัม และหนอนวัยที่ 1 ได้จากแมลงวันทองตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้เป็นจำนวนมากในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียม (artificial diet) สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al., 1973) ศึกษาประสิทธิภาพวิธีการอบไอน้ำ MVHT เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้วัย 1 ในมะม่วงโชคอนันต์ให้ได้ 100 เปอร์เซนต์ โดยการเตรียมมะม่วงให้มีหนอนวัยที่ 1 อยู่ภายในผล ดำเนินการตามขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติของอุดร และ คณะ (2544 ก) โดยใส่หนอนวัยที่ 1 จำนวน 100 ตัว/ผล ทำการอบมะม่วง ด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) อบไอน้ำมะม่วงด้วยวิธีการปรับความชื้นสัมพัทธ์ (50 %RH) ที่อุณหภูมิ 45.0 °ซ, 46 °ซ, 47.0 °ซ, 47.0 °ซ นาน 10 นาที 15 นาที 47.0 และ 20 นาที ลดอุณหภูมิในผลไม้ด้วยละอองน้ำ (shower cooling) หลังจากนั้นเก็บมะม่วงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-27 °ซ ตรวจนับจำนวนหนอนที่รอดชีวิตในผลมะม่วงภายหลังอบไอน้ำ 5 วันทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ การบันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแมลง ด้วยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

□

3. ประเมินประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำ MVHT ในการกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้วัย 1 จำนวนมากในมะม่วงโชคอนันต์

ในแต่ละวิธีการใช้มะม่วงโชคอนันต์จำนวน 20 ผล โดยใส่หนอนวัยที่ 1 จำนวน 100 ตัว/ผล เพิ่มขึ้นถึง 47 องศาเซลเซียส นาน 15, 20 และ 25 นาที การวัดอุณหภูมิผลมะม่วงที่ทดลองอาศัยการวัดจากมะม่วงกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) ซึ่งมีน้ำหนัก 330 ± 5 กรัม/ผล (325-335) กรัม/ผล เมื่ออบมะม่วงครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้ นำมะม่วงที่ผ่านความร้อนออกจากเครื่องอบไอน้ำ ลดอุณหภูมิในผลไม้ด้วยละออง และบันทึกผลการทดลองหลังจากอบมะม่วง 5 วัน หลังจากนั้นเก็บมะม่วงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25-27 °ซ ตรวจนับจำนวนหนอนที่รอดชีวิตในผลมะม่วงภายหลังอบไอน้ำ 5 วันทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ การบันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแมลง ด้วยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น กันยายน 2549 **สิ้นสุด** ตุลาคม 2553 **รวม** 5 **ปี**

โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา 5 ปี ปีที่เสนอขอเป็นปีที่ 5

สถานที่

จังหวัดระยอง จันทบุรี อ่างทอง ชัยนาท สุพรรณบุรี เชียงใหม่ เชียงราย สุโขทัย นครราชสีมา เพชรบูรณ์ และห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในมะม่วงทั้งหมด 4 พันธุ์ คือ เขียวเสวย มหาชนก โชคอนันต์ และหนังกลางวัน พบว่าหนอนแมลงวันผลไม้วัยที่ 1 ในมะม่วงโชคอนันต์ สามารถทนทานต่อความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) มากที่สุด โดยที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ระยะหนอนวัยที่ 1 ในมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย มหาชนก และ หนังกลางวันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในมะม่วงโชคอนันต์พบหนอนมีชีวิตรอด (อัตราการตาย 97.23 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นจึงต้องมีการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของวิธีการอบไอน้ำ MVHT เพื่อหาอุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดแมลงวันผลไม้หนอนวัย 1 ในมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ โดยทดลองอบไอน้ำมะม่วงโชคอนันต์ที่อุณหภูมิ 45.0 °ซ, 46 °ซ, 47.0 °ซ, 47.0 °ซ นาน 10 นาที 15 นาที และ 20 นาที พบว่าหนอนแมลงวันผลไม้มีอัตราการตายที่ 67.98, 96.64,97.87, 99.59, และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

การศึกษายืนยันประสิทธิภาพวิธีการอบไอน้ำแบบ MVHT ในการกำจัดแมลงวันผลไม้จำนวนมาก (2,000 ตัว) ในแต่ละวิธีการ พบว่าในการอบผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ด้วยวิธีการอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 15, 20 และ 25 นาที ทุกวิธีการมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (จากการทดลองจำนวน 1 ซ้ำ)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. หนอนแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* วัยที่ 1 ในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ สามารถทนทานต่อความร้อนจากวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ได้มากกว่าในมะม่วงเขียวเสวย มหาชนก และหนังกลางวัน

2. จากการประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของการอบไอน้ำแบบ MVHT ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบว่าหนอนแมลงวันผลไม้ยังมีการรอดชีวิต แต่เมื่อคงอุณหภูมิ 47 องศาเซสาเซลเซียสไว้นาน 20 นาที พบว่าสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการประเมินประสิทธิภาพการอบไอน้ำแบบ MVHT กับหนอนแมลงวันผลไม้จำนวนมากพบว่า ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ขึ้นไปสามารถกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ผลการทดลองจาก 1 ซ้ำ) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลองที่แน่นอน

3. การทดสอบยืนยันประสิทธิภาพวิธีการอบไอน้ำแบบ MVHT เพื่อเป็นวิธีการทางด้านกักกันพืชในมะม่วงโชคอนันต์ จะต้องทำการประเมินประสิทธิภาพการกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้กับแมลงจำนวนมาก (Large Scale Confirmatory Test) โดยอุณหภูมิและเวลาที่กำหนด ต้องสามารถกำจัดหนอนแมลงวันผลไม้ระยะที่ 1 ในมะม่วงโชคอนันต์ได้ไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว โดยไม่มีแมลงรอดชีวิต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณนวลนิสา ตั้งสัจจะกุล คุณอนุกูล อ้วนเส้ง คุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม คุณมีนา จริงจิตร คุณกัลยา วงศ์สุวรรณ คุณประชุม นุ้ยจำนัล และคุณพิศมัย งามผิวเหลืองที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลอง รวมถึงการเช็คผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, *Mangifera indica* Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, D. *cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 108 p.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisoon and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang Klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes infested with fruit flies (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 342 p.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance : Their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 p.

วิจัยและพัฒนาวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเพื่อการส่งออก

อุดร อุณหวุฒิ รัชฎา อินทรกำแหง สลักจิต พานคำ ชัยณรัตน์ สนศิริ
มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์ ชุติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยา ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของงานทดลองพบว่า พื้นที่ปลูกส้มโอกระจายอยู่ทั่วประเทศ ได้แก่ จังหวัด นครปฐม นครนายก ปราจีนบุรี เชียงราย เลย ชัยนาท ชลบุรี ชุมพร และนครศรีธรรมราช และสามารถแบ่งขนาดของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งเพื่อใช้ในงานทดลองได้ 3 ขนาด คือ 1.ขนาดเล็ก มีน้ำหนัก 700 - 900 กรัม 2.ขนาดกลาง มีน้ำหนัก 900 - 1,100 กรัม และ 3.ขนาดใหญ่ มีน้ำหนัก 1,100 - 1,300 กรัม การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT 50% RH) ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เปรียบเทียบกับพันธุ์ทองดีโดยให้อุณหภูมิภายในผลส้มโอเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที ผลการทดลองพบว่าในการอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และทองดี ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที พบอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 96.22 และ 95.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (จากจำนวน 3 ซ้ำ) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าอัตราการตายเฉลี่ยมีค่าที่ใกล้เคียงกันและเปอร์เซ็นต์การตายยังไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จึงจำเป็นต้องเพิ่มเวลาในการทดลองต่อไป การศึกษาความเสียหายของส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ โดยใช้วิธีการอบไอน้ำด้วยวิธีดังกล่าว โดยอบผลส้มโอที่อุณหภูมิภายในสุดของผลคงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ผลการทดลองอยู่ในขั้นตอนของการวิเคราะห์ข้อมูล

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-09

คำนำ

ส้มโอเป็นหนึ่งในผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญทางด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ ได้แก่ แมลงวันทอง, Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), (Diptera : Tephritidae) (White and Elson-Harris, 1992) ด้วยเหตุนี้ ส้มโอจากประเทศไทยจึงถูกห้ามนำเข้าประเทศญี่ปุ่น ซึ่งไม่มีแมลงชนิดดังกล่าวนี้แพร่ระบาดภายใต้ข้อกำหนดของกฎหมายกักกันพืช ข้อกำหนดนี้จะถูกยกเลิกไปหากประเทศไทยสามารถพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) เพื่อใช้สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอก่อนการส่งออก

ในปี พ.ศ. 2529 กลุ่มวิจัยการกักกันพืช กรมวิชาการเกษตรได้รับความช่วยเหลือทางด้านวิชาการจากรัฐบาลญี่ปุ่นให้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้ความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ oriental fruit fly, *B. dorsalis* และแมลงวันแตง melon fly, *B. cucurbitae* ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน พบว่าวิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment, VHT) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด ได้อย่างมีประสิทธิภาพตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Unhawutti *et al*., 1986) และต่อมาในปี พ.ศ. 2534 ได้มีการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยกรรมวิธีใหม่ คือ วิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ครอบคลุมมะม่วงถึง 4 พันธุ์ ได้แก่ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง (Unhawutti *et al*., 1991) โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของมะม่วง หลังจากนั้นกลุ่มวิจัยการกักกันพืชได้ประสบความสำเร็จจากการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมังคุด (ปี พ.ศ. 2546) มะม่วงพันธุ์มหาชนก (ปี พ.ศ. 2549) (ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว, 2551) และส้มโอพันธุ์ทองดี (ปี พ.ศ. 2549, ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนของการตรวจสอบผลการวิจัยก่อนที่ประเทศญี่ปุ่นจะอนุญาตนำเข้าผลส้มโอจากประเทศไทย) (Unhawutti, 2006) วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) นอกจากมีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ได้แล้ววิธีการดังกล่าวยังมีข้อดีในแง่ของความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลไม้ จึงผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้าหากมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง ในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการสร้างโรงงานกำจัดแมลงวันผลไม้ด้วยความร้อนขนาดใหญ่ระดับการค้ากันอย่างแพร่หลายโดยใช้กรรมวิธีอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (MVHT) ในการอบผลมะม่วง และมังคุดเพื่อการส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น เกาหลี และนิวซีแลนด์ โดยยึดหลักการตามเงื่อนไขและข้อกำหนดของแต่ละประเทศ (มลนิภา, 2550)

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและขาวแตงกวา ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์กับแมลงเป็นจำนวนมาก โดยมีวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ ดังนี้คือ (1) เพื่อยืนยันผลการศึกษาว่าหนอนแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) วัยที่1ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและขาวแตงกวาทนทานต่อความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์มากที่สุด (2) เพื่อกำหนดกระบวนการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่มีประสิทธิภาพกำจัดหนอนวัยที่ 1 จำนวนไม่น้อยกว่า 30,000 ตัว ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและขาวแตงกวาให้ตายทั้งหมด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง 2 เครื่อง
2. ตู้ลดอุณหภูมิผลไม้
3. ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ 2 ห้อง
4. เครื่องอ่างน้ำร้อน
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดของผลไม้
6. เครื่องวัดค่าความหวานของผลไม้
7. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก โดยใช้อุณหภูมิ 27° ซ. และความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก 4 ตู้
9. ห้องเย็นสำหรับเก็บผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง
10. เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์แบบต่อเนื่อง
11. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
13. อุปกรณ์สำหรับเช็คผลการทดลอง ๆ ได้แก่ พู่กัน ปากคีบ เคาท์เตอร์ จานทดลองขนาดเล็ก(plate) ถาดใส่ผลไม้ ถุงผ้าตาข่าย ถุงมือ มีดปอกผลไม้ ถุงขยะดำ และอื่น ๆ

ขั้นตอนการดำเนินงานมีดังนี้

1. รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยาของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานทดลอง
2. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณและเพื่อใช้ในการทดลอง

3. ศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT 50% RH) ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเปรียบเทียบกับทองดี
4. ศึกษาความเสียหาย และคุณภาพของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาด้วยวิธีการอบไอน้ำ
5. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์, ชีววิทยาของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในงานทดลอง

การรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ และชีววิทยา ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งและขาวแตงกวาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของงานทดลอง โดยการค้นหาข้อมูลทางเว็บไซต์ของกรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร และจากแหล่งข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ

2. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง

<u>2.1 แมลงที่ใช้ในการทดลอง</u> : ทำการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นจำนวนมากไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของกลุ่มกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยสภาพของห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5 x 4.6 x 2.3 ม. อุณหภูมิ 25-27 $^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดชีวภาพ (bioluck) จำนวน 20 หลอด ซึ่งได้ติดตั้งไว้บนเพดานห้องและอีกจำนวน 40 หลอดติดตั้งไว้บนผนังรอบห้อง โดยไฟจะสว่างในระหว่างช่วงเวลา 6.00 น – 18.00 น. และติดตั้งหลอดฟลูออเรนเซน ขนาด 40 วัตต์ อีก 1 หลอด เพื่อให้แสงสลัวเลียนแบบสภาพของแสงแดดในช่วงรุ่งเช้า และพลบค่ำซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผสมพันธุ์ของแมลง โดยไฟจะเปิดและปิดในช่วงเวลา 5.30-6.00 น. และ 18.00-18.30 น. สำหรับต้นกำเนิดสายพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ได้มาจากผลน้อยหน่าเก็บรวบรวมในท้องที่อำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา แมลงตัวเต็มวัยจะถูกจำแนกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet)

2.2 หลักปฏิบัติในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ : เลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจำนวนมากประมาณ 20,000 ตัว ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 65.5 x 69 x 77 ซม. กรงแมลงทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมซ ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน enzymatic protein hydrolysate (Amber series 100) 1 ส่วน และ yeast extract 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาด 6 x 7.5 ซม. ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มม. จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยครบ 7 สัปดาห์ ทำลายแมลงที่ยังหลงเหลืออยู่ในกรงทั้งหมด ทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นใหม่ต่อไป ระหว่างการทดลองเตรียมแมลงตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันไว้ไม่น้อยกว่า 5 กรง มีแมลงมากกว่า 100,000 ตัว

2.3 การควบคุมคุณภาพของแมลงวันผลไม้ : แมลงวันผลไม้ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรงเพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ เพื่อที่จะสามารถพบสิ่งผิดปกติและแก้ไขได้ทันที โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักของไข่ (hatching rate) อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

3.ศึกษาเบื้องต้นวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุดในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาด้วยวิธีการอบไอน้ำ

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model : EHK-1000B, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง ส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาที่ใช้ในการทดลองมีน้ำหนัก 1,100 -1,300 กรัม/ผล แมลงวันทองระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง และหนอนวัยที่ 1 ได้จากแมลงวันทองตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้เป็นจำนวนมากในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียม (artificial diet) สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al., 1973) โดยการศึกษาเปรียบเทียบความทนทานต่อความร้อนระหว่างระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ของแมลงวันทองในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา พบว่า หนอนวัยที่ 1 มีความทนทานต่อความร้อนมากกว่าไข่อายุ 24 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ได้ศึกษาเพื่อยืนยันว่าหนอนวัยที่ 1 เป็นระยะการเจริญเติบของแมลงวันทองที่ทนทานต่อความร้อนมากที่สุด โดยการเตรียมส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาให้มีไข่และหนอนวัยที่ 1 อยู่ภายในผล ดำเนินการตามขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติของ อุดร และ คณะ (2544 ก) โดยใส่ไข่และหนอนวัยที่ 1 จำนวนอย่างละ 200 ฟอง/ผล ทำการอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาด้วยวิธีอบไอน้ำ

ปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) โดยช่วงแรกของการเพิ่มอุณหภูมิผลส้มโอขึ้นถึง 43° ซ. อากาศร้อนมีความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงปรับเปลี่ยนเป็นอากาศร้อนที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ โดยอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาให้อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 46 °ซ. และคงความร้อนภายในผลไว้ที่ 46° ซ. เป็นเวลานาน 30 นาที การวัดอุณหภูมิผลส้มโอที่ทดลองอาศัยการวัดจากส้มโอกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 1,200 ± 25 กรัม/ผล (1,175–1,225) กรัม/ผล เมื่ออบส้มโอครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้ นำส้มโอที่ผ่านความร้อนออกจากเครื่องตู้อบความร้อน และทำการลดอุณหภูมิผลส้มโอทันทีโดยการเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model : SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จากนั้นเก็บส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา ที่ทดลองตามรายละเอียดใน Unahawutti (2006) และบันทึกผลการทดลองหลังจากอบส้มโอ 7 วัน โดยการผ่าส้มโอแต่ละผล บันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแมลง ด้วยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

4.ศึกษาความเสียหาย และคุณภาพของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาจากวิธีการอบไอน้ำ

ทำการทดลองกับส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา โดยการอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา ด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) ซึ่งหลักการทำงานของวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ ในช่วงแรกจะเป็นการอบส้มโอโดยใช้อากาศร้อน (Hot air treatment, HAT) ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ หลังจากส้มโอมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 43 °ซ. จึงปรับเปลี่ยนไปเป็นวิธีการอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) อากาศร้อนอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวด้วยไอน้ำ ซึ่งมีความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาให้อุณหภูมิภายในสุดผลเพิ่มขึ้นถึง 46 °ซ. และคงความร้อนภายในผลไว้ที่ 46 °ซ. เป็นเวลานาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ซึ่งการวัดอุณหภูมิผลส้มโอที่ทดลองอาศัยการวัดจากส้มโอกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 1,000 ± 25 กรัม/ผล (975–1,025) กรัม/ผล เมื่ออบส้มโอครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้ นำส้มโอที่ผ่านความร้อนออกจากเครื่องตู้อบความร้อน และทำการลดอุณหภูมิผลส้มโอทันทีโดยการเป่าด้วยพัดลมนาน 1 ชั่วโมง ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model : SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จากนั้นแยกเก็บส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา ที่ผ่านความร้อนด้วยวิธีการอบไอน้ำปรับสภาพ

ความชื้นสัมพัทธ์ในสภาพอุณหภูมิต่ำ 5 และ 10 ° ซ. ภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นขนาดเล็ก ตามรายละเอียดใน Unahawutti (2006) และบันทึกผลการทดลองหลังจากอบส้มโอ 7 วัน โดยการผ่าผลส้มโอแต่ละผล บันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของสีผิวเปลือกส้มโอ และบันทึกผลค่าความเป็นกรด (acidity) และค่าความหวาน (brix) ของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาตามลำดับ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น กันยายน 2549 **สิ้นสุด** ตุลาคม 2553 **รวม** 5 **ปี**
โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา 5 ปี ปีที่เสนอขอเป็นปีที่ 3

สถานที่

นครปฐม นครนายก ปราจีนบุรี เชียงราย เชียงใหม่ เลย ชัยนาท ชุมพร นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ขอนแก่น สกลนคร กาฬสินธุ์ มหาสารคาม นครราชสีมา สุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยา ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของงานทดลองพบว่า พื้นที่ปลูกส้มโอกระจายอยู่ทั่วประเทศ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นครนายก ปราจีนบุรี เชียงราย เลย ชัยนาท ชุมพร และนครศรีธรรมราช (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) นอกจากนี้ทำให้ทราบว่าขนาดของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ใช้ทดลองสามารถแบ่งได้ 3 ขนาด คือ1.ขนาดเล็ก (S) มีน้ำหนัก 700 – 900 กรัม 2.ขนาดกลาง (M) มีน้ำหนัก 900 – 1,100 กรัม 3.ขนาดใหญ่ (L) มีน้ำหนัก 1,100 – 1,300 กรัม การเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จำนวนมากด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลองทำให้ได้ไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในจำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ และเพียงพอต่อการทดลอง การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT 50% RH) ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เปรียบเทียบกับพันธุ์ทองดีโดยให้อุณหภูมิภายในสุดของผลส้มโอเท่ากับ 45 ° ซ. เป็นเวลานาน 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที ผลการทดลองพบว่าในการอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และทองดี ที่อุณหภูมิ 45 ° ซ. นาน 50 นาที พบอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 96.22 และ 95.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (จากจำนวน 3 ซ้ำ) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าอัตราการตายเฉลี่ยมีค่าที่ใกล้เคียง

กันและเปอร์เซ็นต์การตายยังไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จึงจำเป็นต้องเพิ่มเวลาในการทดลองต่อไป การศึกษาความเสียหายของส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ โดยใช้วิธีการอบไอน้ำด้วยวิธีดังกล่าว โดยอบผลส้มโอที่อุณหภูมิภายในสุดของผลคงอยู่ที่ 46 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ผลการทดลองอยู่ในขั้นตอนของการวิเคราะห์ข้อมูล

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ ชีววิทยา ของส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของงานทดลอง ซึ่งพื้นที่ปลูกส้มโอกระจายอยู่ทั่วประเทศ ได้แก่ จังหวัดนครปฐม นครนายก ปราจีนบุรี เชียงราย เลย ชัยนาท ชุมพร และนครศรีธรรมราช นอกจากนี้ทำให้ทราบว่าขนาดของผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้งที่ใช้ทดลองสามารถแบ่งได้ 3 ขนาด คือ1.ขนาดเล็ก (S) มีน้ำหนัก 700 – 900 กรัม 2.ขนาดกลาง (M) มีน้ำหนัก 900 – 1,100 กรัม 3.ขนาดใหญ่ (L) มีน้ำหนัก 1,100 – 1,300 กรัม
2. ได้ไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้จำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้สำหรับงานทดลอง
3. การศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นของวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT 50% RH) ในการกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะหนอนวัยที่ 1 ในผลส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง เปรียบเทียบกับพันธุ์ทองดีโดยให้อุณหภูมิภายในผลส้มโอเท่ากับ 45 °ซ. เป็นเวลานาน 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 นาที ผลการทดลองพบว่าในการอบส้มโอพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง และทองดี ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที พบอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 96.22 และ 95.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (จากจำนวน 3 ซ้ำ) จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าอัตราการตายเฉลี่ยมีค่าที่ใกล้เคียงกันและเปอร์เซ็นต์การตายยังไม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ จึงจำเป็นต้องเพิ่มเวลาในการทดลองต่อไป
4. การศึกษาความเสียหายของส้มโอทั้ง 2 พันธุ์ โดยใช้วิธีการอบไอน้ำด้วยวิธีดังกล่าว โดยอบผลส้มโอที่อุณหภูมิภายในสุดของผลคงอยู่ที่ 46 °ซ. นาน 0, 1 และ 2 ชั่วโมง ผลการทดลองอยู่ในขั้นตอนของการวิเคราะห์ข้อมูล

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณอนุกูล อ้วนเส้ง คุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม คุณมีนา จริงจิตร คุณกัลยา วงศ์สุวรรณ คุณประชุม นุ้ยจำนัล และคุณพิศมัย งามผิวเหลือง ที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลอง รวมถึงการเช็คผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2541. ส้มโอไม้ผลเศรษฐกิจ. [ออนไลน์] [อ้างถึง 30 มีนาคม 2552] เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://web.ku.ac.th/agri/somo2/index.html.

มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์. 2550. โรงงานอบไอน้ำเพื่อการส่งออก. คู่มืออารักขาพืช 13(1):2 หน้า.

ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2551. กำจัดแมลงวันทองด้วยความร้อนดันผลไม้ไทยโกอินเตอร์ฯ[ออนไลน์] [อ้างถึง 30 มีนาคม 2552] เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.phtnet.org/news51/view-news.asp?nID=86.

อุดร อุณหวุฒิ สลักจิต พานคำ และ พิทวัฒน์ อ่อนทองหลาง. 2544 ก. ความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันทองระยะไข่และหนอนในผลมังคุดต่อวิธีอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์, น. A1-A25. ใน รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลมังคุดเพื่อการส่งออก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, *Mangifera indica* Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, D. *cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 108 p.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisoon and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang Klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes infested with fruit flies (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 342 p.

Unahawutti, U. 2006. Development of Heated-Air Quarantine Treatment for Pummelo Infested with Oriental fruit fly (Diptera : Tephritidae). Proposed Research Protocol Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chattuchak, Bangkok. 98 p.

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.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance : Their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 p.

วิจัยและพัฒนาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยและวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลเงาะเพื่อการส่งออก

สลักจิต พานคำ อุดร อุณหวุฒิ รัชฎา อินทรกำแหง วลัยกร รัตนเดชากุล
วรัญญา มาลี ชัยณรัตน์ สนศิริ มลนิภา ศรีมาตรภิรมย์
ชุติมา อ้อมกิ่ง จารุวรรณ จันทรา
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณแมลงวันผลไม้ Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) จำนวนมากด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณไข่ และหนอนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ได้ในจำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) โดยใส่ไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 15 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลเงาะโดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ได้ โดยมีอัตรการตายเฉลี่ยเท่ากับ 99.3, 98.9, 99.9 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหนอนวัยที่ 1 มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะไข่ หนอนวัยที่ 2 และ 3 (จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ)

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-09

คำนำ

เงาะเป็นหนึ่งในผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ที่มีความสำคัญด้านกักกันพืชระหว่างประเทศ ได้แก่ แมลงวันทอง, Oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel), (Diptera : Tephritidae) (White and Elson-Harris, 1992) ด้วยเหตุนี้ เงาะจากประเทศไทยจึงถูกห้ามนำเข้าประเทศญี่ปุ่น ซึ่งไม่มีแมลงชนิดดังกล่าวนี้แพร่ระบาดภายใต้ข้อกำหนดของกฎหมายกักกันพืช ข้อกำหนดนี้จะถูกยกเลิกไปหากประเทศไทยสามารถพัฒนาวิธีการกำจัดศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (plant quarantine treatment) เพื่อใช้สำหรับกำจัดแมลงวันทองในผลเงาะก่อนการส่งออก

ในปีพ.ศ. 2529 กรมวิชาการเกษตรโดยความช่วยเหลือทางด้านวิชาการจากรัฐบาลญี่ปุ่นได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ความร้อนในการกำจัดแมลงวันทอง และแมลงวันแตง, Melon fly, *Bactrocera cucurbitae* Coquillett, ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน ผลการศึกษาพบว่า วิธีการอบไอน้ำ (Vapor heat treatment, VHT) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงวันผลไม้ทั้ง 2 ชนิด ในผลมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน และได้ตามมาตรฐานของวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช (Unhawutti et al., 1986) และต่อมาในปี พ.ศ. 2534 ได้มีการวิจัยและพัฒนาวิธีกำจัดแมลงด้วยความร้อนด้วยกรรมวิธีใหม่ คือ วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) ที่มีประสิทธิภาพสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงครอบคลุมถึง 4 พันธุ์ คือ หนังกลางวัน น้ำดอกไม้ แรด และพิมเสนแดง โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพของผลมะม่วง (Unhawutti et al., 1991) หน่วยงานกักกันพืชของประเทศญี่ปุ่นยอมรับให้ใช้เป็นวิธีกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช เพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลมะม่วงก่อนการส่งออก ต่อมาจึงมีการสร้างโรงงานกำจัดแมลงด้วยความร้อนขนาดใหญ่ระดับการค้าเกิดขึ้น วิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งกรรมวิธีซึ่งอาศัยอากาศเป็นสื่อนำความร้อน ได้มีการศึกษาวิจัยกันอย่างกว้างขวางในหลายประเทศว่าสามารถกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลไม้ได้หลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังมีข้อดีในแง่ของความปลอดภัยจากสารพิษตกค้างภายในผลไม้ จึงผ่านการยอมรับได้โดยง่ายจากประเทศผู้นำเข้าหากมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง ซึ่งเงาะเป็นผลไม้ที่มีปัญหาการส่งออกเกี่ยวข้องกับแมลงวันผลไม้

ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับสำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลเงาะ ด้วยเหตุนี้ความพยายามที่จะขยายตลาดการส่งออกไปยังประเทศที่ห้ามนำเข้าเงาะสดจากประเทศไทย จึงจำเป็นที่จะต้องมีการพิสูจน์สถานภาพการเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ในผลเงาะและศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีการกำจัดแมลงด้วยความร้อนซึ่งใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับ

ผลเงาะ เพื่อวิจัย และพัฒนาให้เป็นวิธีการกำจัดศัตรูพืชด้านกักกันพืช สำหรับกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลเงาะก่อนการส่งออก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้อบไอน้ำกำจัดแมลงขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง 2 เครื่อง
2. ตู้ลดอุณหภูมิผลไม้ 1 เครื่อง
3. ห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้ 2 ห้อง
4. เครื่องอ่างน้ำร้อน
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดของผลไม้
6. เครื่องวัดค่าความหวานของผลไม้
7. ห้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก โดยใช้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์
8. ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสำหรับงานทดลองขนาดเล็ก 3 ตู้
9. ห้องเย็นสำหรับเก็บผลไม้ที่ใช้ในการทดลอง
10. เครื่องบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์แบบต่อเนื่อง
11. แท่งวัดอุณหภูมิขนาดเล็กสำหรับงานทดลอง
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับงานทดลอง
13. อุปกรณ์สำหรับเช็คผลการทดลอง ได้แก่ พู่กัน ปากคีบ เคาท์เตอร์ จานทดลองขนาดเล็ก(plate) ถาดใส่ผลไม้ ถุงผ้าตาข่าย ถุงมือ มีดปอกผลไม้ ถุงขยะดำ และอื่น ๆ

ขั้นตอนการดำเนินงานมีดังนี้

1. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณและเพื่อใช้ในการทดลอง
2. ศึกษาสถานภาพการเป็นพืชอาศัยของแมลงวันผลไม้ในผลเงาะ
3. ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ในผลเงาะ
4. ศึกษาเบื้องต้นการกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำ
5. ศึกษาด้านความเสียหายของผลเงาะจากวิธีการอบไอน้ำ
6. รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงแมลงวันผลไม้จำนวนมากด้วยอาหารเทียมเพื่อเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการทดลอง

1.1 แมลงที่ใช้ในการทดลอง : ทำการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เป็นจำนวนมากไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดลอง โดยเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงแมลงของกลุ่มกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ โดยสภาพของห้องเลี้ยงแมลงวันผลไม้เป็นห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และแสงสว่าง ห้องเลี้ยงแมลงมีขนาด 3.5 x 4.6 x 2.3 ม. อุณหภูมิ 25-27 $^{\circ}$ ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 65 $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่างภายในห้องได้จากหลอดชีวภาพ (bioluck) จำนวน 20 หลอด ซึ่งได้ติดตั้งไว้บนเพดานห้องและอีกจำนวน 40 หลอดติดตั้งไว้บนผนังรอบห้อง โดยไฟจะสว่างในระหว่างช่วงเวลา 6.00 น – 18.00 น. และติดตั้งหลอดฟลูออเรนเซนขนาด 40 วัตต์ อีก 1 หลอด เพื่อให้แสงสลัวเลียนแบบสภาพของแสงแดดในช่วงรุ่งเช้า และพลบค่ำซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผสมพันธุ์ของแมลง โดยไฟจะเปิดและปิดในช่วงเวลา 5.30-6.00 น. และ 18.00-18.30 น. สำหรับต้นกำเนิดสายพันธุ์ของแมลงวันผลไม้ได้มาจากผลน้อยหน่าเก็บรวบรวมในท้องที่อำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา แมลงตัวเต็มวัยจะถูกจำแนกชนิดอย่างละเอียดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งคัดแยกเอาเฉพาะแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยไปเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการและเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นโดยอาศัยวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม (artificial diet)

1.2 หลักปฏิบัติในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ : เลี้ยงแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจำนวนมากประมาณ 20,000 ตัว ไว้ในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 65.5 x 69 x 77 ซม. กรงแมลงทำด้วยมุ้งลวดตาข่ายอลูมิเนียมขนาด 16 เมตร ภายในกรงมีจานพลาสติกบรรจุอาหารสำหรับตัวเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมโดยน้ำหนักดังนี้ น้ำตาล 10 ส่วน enzymatic protein hydrolysate (Amber series 100) 1 ส่วน และ yeast extract 1 ส่วน การให้น้ำจะใช้ขวดพลาสติกทรงกระบอกขนาด 6 x 7.5 ซม. ฝาขวดเจาะรูขนาด 1 มม. จำนวน 3 รู วิธีให้น้ำจะคว่ำขวดน้ำลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนหลังกรงเลี้ยงแมลง หลังจากเลี้ยงแมลงตัวเต็มวัยครบ 7 สัปดาห์ ทำลายแมลงที่ยังหลงเหลืออยู่ในกรงทั้งหมด ทำความสะอาดกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเตรียมไว้สำหรับใส่แมลงในรุ่นใหม่ต่อไป ระหว่างการทดลองเตรียมแมลงตัวเต็มวัยอายุต่างๆ กันไว้ไม่น้อยกว่า 5 กรง มีแมลงมากกว่า 100,000 ตัว

1.3 การควบคุมคุณภาพของแมลงวันผลไม้ : แมลงวันผลไม้ซึ่งเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการจะต้องมีความแข็งแรงเพื่อที่ข้อมูลจากผลการศึกษาวิจัยจะได้ถูกต้องและเป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของแมลงเป็นประจำ เพื่อที่จะสามารถพบสิ่งผิดปกติและแก้ไขได้ทันที โดยในการเลี้ยงแมลงแต่ละรุ่นจะตรวจสอบอัตราการฟักของไข่ (hatching rate) อัตราการ

ออกเป็นตัวเต็มวัย (emerging rate) น้ำหนักของดักแด้ และอัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio)

2. ศึกษาเบื้องต้นวิธีกำจัดแมลงวันผลไม้ในผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำ

ดำเนินการทดลองโดยใช้เครื่องตู้อบความร้อนกำจัดแมลงวันผลไม้ “Sanshu” Vapor Heat Treatment System (Differential Pressure Type) (model : EHK-1000B, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จำนวน 2 เครื่อง ผลเงาะที่ใช้ในการทดลอง คือ เงาะพันธุ์โรงเรียน ซึ่งมีน้ำหนัก 30-40 กรัม/ผล การอบผลเงาะใช้ 2 วิธีการคือ 1.วิธีการอบไอน้ำ (Vapor Heat Treatment , VHT) และ2. วิธีการอบไอน้ำปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified vapor heat treatment, MVHT) แมลงวันผลไม้ระยะไข่อายุ 24 ชั่วโมง และหนอนวัยที่ 1 ได้จากแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยซึ่งเลี้ยงไว้เป็นจำนวนมากในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียม (artificial diet) สูตรข้าวโพดป่น (Watanabe et al., 1973) ในการเตรียมผลเงาะให้มีไข่และหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ให้อยู่ภายในผล ดำเนินการตามขั้นตอนและวิธีการปฏิบัติของ อุดร และ คณะ (2544 ก) โดยใส่ไข่และหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ตามจำนวนที่ได้จาการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแมลงวันผลไม้ในผลเงาะ การวัดอุณหภูมิผลเงาะที่ทดลองอาศัยการวัดจากผลเงาะกำหนดอุณหภูมิ (sensor fruit) จำนวน 3 ผล น้ำหนัก 35-37 กรัม/ผล เมื่ออบเงาะครบตามอุณหภูมิ และระยะเวลาที่กำหนดไว้โดยให้อุณหภูมิภายในสุดผลเงาะคงอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 10, 20.30, 40 และ 50 นาที ตามลำดับ ต่อจากนั้นนำเงาะที่ผ่านความร้อนออกจากตู้อบไอน้ำ และทำการลดอุณหภูมิผลเงาะทันที ในเครื่องลดอุณหภูมิผลไม้ “Sanshu” Shower Cooling System (Differential Pressure Type) (model : SHS-12, Sanshu Sangyo Co., Ltd., Kagoshima, Japan) จากนั้นเก็บผลเงาะที่ทดลองตามรายละเอียดใน Unahawutti (2005) และบันทึกผลการทดลองหลังจากอบผลเงาะ 7 วัน โดยการผ่าเงาะแต่ละผล บันทึกจำนวนแมลงรอดชีวิต คำนวณอัตราการตายของแมลง ด้วยสูตรของ Abbott (Abbott, 1925)

เวลาและสถานที่ -

ระยะเวลาเริ่มต้น กันยายน 2549 **สิ้นสุด** ตุลาคม 2554 **รวม** 5 **ปี**
โครงการวิจัยต่อเนื่องระยะเวลา 5 ปี ปีที่เสนอขอเป็นปีที่ 2

สถานที่

จังหวัดระยอง จันทบุรี ตราด ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ขอนแก่น สกลนคร กาฬสินธุ์ มหาสารคาม นครราชสีมา สุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานกำจัดศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) โดยใส่ไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 15 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลเงาะโดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ได้ โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 99.3, 98.9, 99.9 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหนอนวัยที่ 1 มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะไข่ หนอนวัยที่ 2 และ 3 (จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

1. ได้ไข่และหนอนของแมลงวันผลไม้จำนวนไม่ต่ำกว่า 50,000 ตัว ในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้สำหรับงานทดลอง

2. การศึกษาความทนทานต่อความร้อนของแมลงวันผลไม้ *B. dorsalis* ในระยะไข่เปรียบเทียบกับระยะหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ในผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำแบบปรับสภาพความชื้นสัมพัทธ์ (Modified Vapor Heat Treatment, MVHT) โดยใส่ไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ของแมลงวันผลไม้ จำนวน 15 ฟอง/ตัว ต่อผล เข้าไปในผลเงาะโดยตรง (artificial inoculation) และนำไปอบไอน้ำเพื่อกำจัดแมลงวันผลไม้ ผลการทดลองพบว่าในการอบผลเงาะด้วยวิธีการอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที มีประสิทธิภาพกำจัดแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 ได้ โดยมีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 99.3, 98.9, 99.9 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหนอนวัยที่ 1 มีแนวโน้มทนทานต่อความร้อนมากกว่าระยะไข่ หนอนวัยที่ 2 และ 3 (จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณอนุกูล อ้วนเส้ง คุณสมิทธิ์ อยู่เอี่ยม คุณมีนา จริงจิตร คุณกัลยา วงศ์สุวรรณ คุณประชุม นุ้ยจำนัล และคุณพิศมัย งามผิวเหลือง ที่มีส่วนช่วยในการเตรียมการทดลอง รวมถึงการเช็คผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.

Unahawutti, U., C. Chettanachitara, M. Poomthong, P. Konson, E. Smitasiri, C. Lapasathukool, W. Worawisitthumrong and R. Intarakumheng. 1986. Vapor heat treatment for 'Nang Klarngwun' mango, *Mangifera indica* Linn., infested with eggs and larvae of the oriental fruit fly, *Dacus dorsalis* Hendel and the melon fly, D. *cucurbitae* Coquillett (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 108 p.

Unahawutti, U., M. Poomthong, R. Intarakumheng, W. Worawisitthumrong, C. Lapasathukool, E. Smitasiri, P. Srisoon and C. Ratanawaraha. 1991. Vapor heat as plant quarantine treatment of 'Nang Klarngwan', 'Nam Dorkmai', 'Rad' and 'Pimsen Daeng' mangoes infested with fruit flies (Diptera : Tephritidae). Technical Plant Quarantine Sub-Division, Agricultural Regulatory Division, Department of Agriculture, Bangkok. 342 p.

White, I.M. and M.M. Elson-Harris. 1992. Fruit flies of economic significance : Their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK. 601 p.

การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์พืชสกุลแตงบางชนิดเพื่อการส่งออก

Efficiency of Chemical to Control *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* some cucubits seeds for Export

วันเพ็ญ ศรีชาติ ศรีวิเศษ เกษสังข์ ปรียพรรณ พงศาพิชณ์
ชลธิชา รักใคร่ วานิช คำพานิช ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคผลเน่าแบคทีเรีย (Bacterial fruit blotch) ของพืชตระกูลแตง สาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) จากการเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชสุกลแตงเพื่อการส่งออกของเกษตรกรจากภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 47 แปลง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ แตงโม เมลอน แตงกวาและ ฟักทอง พบว่า ทุกเชื้อสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและในบางพืชทดสอบต้นกล้าเกิดอาการใบเน่าเละและต้นเหี่ยวทั้งต้น และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและตรวจด้วยเทคนิค ELISA ผลปรากฏว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทให้ผลเป็นลบ และจากความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 2 ไอโซเลท ทำการทดสอบการเกิดโรคกับพืช 5 ชนิด คือ บวบเหลี่ยม แตงโม แตงกวา เมลอนและ ฟักทอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัวโดยที่ต้นไม่เน่าเละในทุกพืชทดสอบ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโม พบว่า สามารถปลูกเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโมนาน 48 ชั่วโมง สามารถทำให้เกิดโรคกับแตงโมได้ดี และสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จากเมล็ดพันธุ์แตงโมได้ดี คือ สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิคเข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ),สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-01-02-06-51

คำนำ

ประเทศไทยมีการผลิตแตงโมและแตงต่างๆ เพื่อการบริโภคผลสดเป็นจำนวนมาก และยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกที่สำคัญ อีกทั้งเกษตรกรมีทักษะในการเพาะปลูก ค่าแรงงานต่ำเมื่อเทียบกับประเทศอื่นๆ และเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้มีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของประเทศต่างๆ ทั่วโลก เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ในประเทศไทยแม้จะมีคุณภาพดีคือ ความงอกสูง ความตรงต่อสายพันธุ์สูง แต่ผู้ซื้อหลายประเทศยังต้องการให้รับรองการปลอดโรคพืชโดยระบุข้อความลงในใบรับรองปลอดศัตรูพืชว่าเมล็ดพันธุ์พืชดังกล่าวได้จากพืชปราศจากเชื้อโรคพืชที่สำคัญบางชนิดในช่วงพืชเจริญเติบโตในแปลงปลูก และเมล็ดพันธุ์หลังเก็บเกี่ยวปราศจากเชื้อโรคพืชสำคัญบางชนิด แต่พบว่า ในปี พ.ศ. 2534 มีรายงานพบโรคผลเน่าของแตงโมในพื้นที่ปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญของประเทศ และในปีต่อมาพบว่าโรคนี้ระบาดทำความเสียหายต่อผลผลิตแตงโมผลสด และแตงโมสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์ซึ่งได้รับความเสียหายมากกว่า 50% (Pinyapong, 1994) และจากการนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากผลที่เกิดโรคพบว่าอัตราการเข้าทำลายมากกว่า 80% (Kucharek et al., 1993) และมีรายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าสามารถติดกับเมล็ดพันธุ์ เมื่อนำไปปลูกในฤดูต่อไปได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการส่งเสริมการผลิตแตงสำหรับบริโภคผลสดและผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรคและการจัดการโรคผลเน่าแบคทีเรียได้อย่างถูกต้อง จึงได้ศึกษาหาวิธีการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.) ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคที่ผ่านทางเมล็ดและสามารถส่งเมล็ดพันธุ์ไปจำหน่ายยังต่างประเทศได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงปลูกพืชตระกูลแตงของเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Nutrient Agar (NA) Starch Agar King's medium B เป็นต้น
3. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสารเคมีที่ใช้ในการทดลองกำจัดเชื้อ
4. ชุดตรวจสอบ Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA Kit) ของ Agdia สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac.)
5. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. โรงเรือนปลูกพืชที่มีตาข่ายกันแมลง
7. วัสดุและอุปกรณ์ในการปลูกพืช
8. วัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพืช

วิธีการ

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคผลเน่าของพืชสกุลแตงจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบและผลของพืชสกุลแตง ได้แก่ แตงโม แตงกวา เมลอน ฟักทองและสควัอช ที่แสดงลักษณะอาการโรคผลเน่าของพืชสกุลแตงจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก ในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร อุบลราชธานี สกลนคร ลำปาง น่านและกาญจนบุรี โดยเก็บตัวอย่างอาการที่สงสัยนำตัวอย่างมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากโรคผลเน่าของพืชสกุลแตง

นำตัวอย่างใบที่มีอาการของโรคผลเน่ามาล้างด้วยน้ำสะอาด และทำความสะอาดที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรคมาบดให้ละเอียด ใส่เนื้อเยื่อพืชที่บดแล้วลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อที่บรรจุในหลอดทดสอบคนให้เข้ากัน แล้วนำมาแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีสีขาวใส รูปร่างกลมนูน ขอบเรียบขนาดเล็ก นำมาเพิ่มปริมาณบนอาหาร NA โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนตัวอย่างอาการผลเน่า ให้ทำการแยกเชื้อโดยทำความสะอาดผิวเปลือกบริเวณแผลด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วใช้มีดฆ่าเชื้อโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ รอให้มีดเย็น ตัดบริเวณผิวเปลือกของผลออก แล้วจึงใช้มีดฆ่าเชื้อเจาะเอาเนื้อผลบริเวณแผล วางลงบนสไลด์กระจกฆ่าเชื้อ หยดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อบดตัวอย่างให้ผสมกับน้ำกลั่น แล้วนำไปแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อดำเนินการเช่นเดียวกับที่แยกเชื้อจากใบที่เกิดอาการโรค จนได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่สงสัยในพืชสกุลแตง

นำเชื้อแบคทีเรีย ที่แยกได้นำมาศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนพืชทดสอบคือ ต้นกล้าแตงโม เมลอน แตงกวาและฟักทอง โดยการเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียทดสอบ โดยนำเชื้อที่คัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหาร NA ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารและใช้เข็มเขี่ยรูปทรงกลมกวาดโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียออกจากผิวหน้าอาหาร ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.25 เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^6-10^8 cfu/มิลลิลิตร สำหรับนำไปปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ

การปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าลงบนพืชทดสอบ โดยเตรียมพืชทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ ต้นกล้าบวบเหลี่ยม เมลอน แตงโม แตงกวา และฟักทอง อายุ 15 วัน ต้นกล้ามีใบจริง

จำนวน 2 ใบ ใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากอาการที่ผลและใบของโรคผลเน่าที่เก็บตัวอย่างจากแปลง, สารแขวนลอยแบคทีเรียที่ได้เชื้อจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยกได้จากแตงโม (WMKK) แล้วจึงทำการฉีดสารแขวนลอยแบคทีเรีย เข้าใต้ใบเลี้ยงของพืชทดสอบปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร แล้วจึงคลุมต้นพืชทดสอบด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปิดถุงพลาสติกออก ตั้งแต่เริ่มเพาะเมล็ดจนกระทั้งตรวจผล ต้องราดน้ำลงบนพื้นโรงเรือนเช้าและเย็น เพื่อควบคุมเปอร์เซ็นต์ความชื้นให้อยู่ที่ 60-70 เปอร์เซ็นต์และอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 28-35 องศาเซลเซียส สังเกตอาการของโรคบนใบเลี้ยงของพืชทดสอบเปรียบเทียบกับต้นพืชชุดควบคุมที่ทำการปลูกเชื้อโดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของพืชสกุลแตง

4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค direct ELISA มีขั้นตอนดังนี้

4.1.1 เขียนแผนผังของการตรวจตัวอย่าง บัฟเฟอร์ (buffer), ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control), ชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) ข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ตรวจ และ antiserum ที่ใช้ ลงบน แผนผังการทดลอง (loading diagram) ให้ครบสมบูรณ์

4.1.2 เจือจาง capture antibody ที่จำเพาะกับเชื้อ Aac. ด้วยสารละลาย Coating buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 200 จากนั้นเติมสารละลาย capture antibody ดังกล่าวลงในหลุมอีไลซ่าหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมงหรือทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.3 ล้างหลุมอีไลซ่าด้วย PBST buffer 7 - 8 ครั้ง จากนั้นเคาะหลุมอีไลซ่าให้แห้ง

4.1.4 ปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยแบคทีเรียให้ได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/มิลลิลิตรหรือเตรียมตัวอย่าง 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตรด้วยสารละลาย General extraction buffer

4.1.5 เติมสารละลาย General extract buffer, บัฟเฟอร์ (buffer), ชุดควบคุมที่ให้ผลลบ (negative control), ชุดควบคุมที่ให้ผลบวก (positive control) และ ตัวอย่างสารแขวนลอยแบคทีเรีย ลงใน ELISA Plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ตามตำแหน่งบนแผนผังที่เขียนไว้ จากนั้นนำไปบ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงหรือทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1.6 ล้างหลุมอีไลซ่าด้วย PBST buffer 7 - 8 ครั้ง จากนั้นเคาะหลุมอีไลซ่าให้แห้ง

4.1.7 เติม 1 เท่าของEnzyme conjugate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุมอีไลซ่า นำไปบ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4.1.8 ล้างหลุมอีไลซ่าด้วย PBST buffer 7 - 8 ครั้ง จากนั้นเคาะหลุมอีไลซ่าให้แห้ง

4.1.9 เติมสารละลาย PNP substrate ลงใน หลุมอีไลซ่าหลุมละ 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มในกล่องชื้น นาน 30-60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3 โมล โซเดียมคลอไรด์ (3 M NaCl) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลด้วยตาเปล่าหรือนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านผลอีไลซ่า (ELISA reader) ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะให้สีเหลืองและตัวอย่างที่ปกติจะใส

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

ดำเนินการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการผลเน่า และตรวจสอบด้วย เทคนิค indirect ELISA เพื่อเป็นการตรวจสอบยืนยันการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย 7 วิธี ดังนี้

4.2.1. ความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis)

4.2.2. ปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase reaction)

4.2.3. การสร้างสารเรืองแสง (Fluorescent pigment production)

4.2.4. การไฮโครไลด์ arginine (Arginine hydrolase activity)

4.2.5 การสร้าง Levan (Levan production)

4.2.6 ปฏิกิริยาไลโปโลติต (Lypolytic activity)

4.2.7 การรีดิวซ์ในเตรท (Nitrate reduction)

5. การทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในพืชสกุลแตงบางชนิด

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร)ให้มีความขุ่นเมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโมเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.25 ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียประมาณ 10^6-10^8 cfu/มิลลิลิตรนำสารละลายเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร ปริมาตร 300 ไมโครลิตรต่อ 1 จานอาหาร แล้วนำกระดาษกรองที่แช่ในสารทดสอบชนิดต่างๆ วางตรงกลางจานอาหาร ซึ่งสารเคมีที่นำมาทดสอบ จำนวน 5 ชนิด ชนิดละ 3 ความเข้มข้นและชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) รวมทั้งสิ้น16 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 2 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 3 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 4 สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (สารซีนามิ 100) เข้มข้น 55 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (สารซีนามิ 100) เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ)

กรรมวิธีที่ 6 สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (สารซีนามิ 100) เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride) เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 8 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride) เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 9 สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride) เข้มข้น 10.0เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 10 สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 11 สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate) เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 12 สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate) เข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 13 สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 14 สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 15 สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

กรรมวิธีที่ 16 ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)

นำจานอาหารทดสอบบ่มอุณหภูมิ 24-35 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ทำการวัดขนาดวงใสที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

5.2.1 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม

นำเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร (WMPD1228)) เลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาเตรียมสารแขวนลอยแบคทีเรียให้มีความขุ่น 0.25 (เมื่อวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร) หลังจากนั้นดูดสารแขวนลอยแบคทีเรียปริมาตร 300 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร Nutrient blotch ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่หยดสาร tween 80 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำเมล็ดพันธุ์แตงโมที่สมบูรณ์ที่ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร๊อกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์นาน 3 นาที แล้วนำเมล็ดฆ่าเชื้อต่อด้วยแอลกอฮอล์

เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที แล้วฆ่าเชื้อด้วยคลอร๊อกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำไปผึ่งให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อจนแห้ง นำเมล็ดพันธุ์ที่ได้ทดสอบการปลูกเชื้อโดยใช้เมล็ดพันธุ์ 100 เมล็ด แช่กับสารแขวนลอยแบคทีเรีย นำตั้งบนเครื่องเขย่าบ่มในอุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เมล็ดแตงโมแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียนาน 12 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2 เมล็ดแตงโมแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 3 เมล็ดแตงโมแช่ในสารแขวนลอยแบคทีเรียนาน 48 ชั่วโมง

หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปปลูกในดินฆ่าเชื้อในโรงเรือนเป็นเวลา 14 วัน บันทึกผลเปอร์เซ็นต์ความงอก อาการที่เกิดบนใบเลี้ยงของต้นแตงโม นำใบเลี้ยงที่มีอาการของโรคนำมาตรวจด้วยวิธี ELISA และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าเป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นกล้าทั้งหมด}} \times 100$$

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

ทำการปลูกเชื้อบนเมล็ดพันธุ์แตงโมตามระยะเวลาที่เกิดโรคได้ดีจากข้อ 5.2.1 หลังจากนั้นนำเมล็ดแตงโมที่ได้ มาทำการกำจัดเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า โดยแช่เมล็ดแตงโมในสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ผลดีจากข้อ 5.1 เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลดี ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์, สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ), สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร, สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5, 5.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์, เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว ชุดควบคุมมี 2 ชุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่เขย่าในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง และเมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ ซึ่งเมล็ดแตงโมทดสอบจากทุกกรรมวิธีหลังจากล้างด้วยน้ำประปาแล้วนำไปผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน ในอุณหภูมิห้อง แล้วจึงทำการเพาะเมล็ดแตงโมในตะกร้าพลาสติก 100 เมล็ดต่อกรรมวิธี วางตะกร้าเพาะเมล็ดพันธุ์ในโรงเรือนที่มีตาข่ายกันแมลง ที่มีอุณหภูมิ 24-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน แล้วคลุมตะกร้าพืชทดสอบด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงเปิดถุงพลาสติกสังเกตอาการกับต้นกล้าของแตงโมหลังการเพาะเมล็ด 14 วัน และนำอาการของต้นแตงโมที่สงสัยตรวจด้วยวิธีอีไลซ่า ทำการ

บันทึกจำนวนต้นที่งอก และจำนวนต้นที่เป็นโรคนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การงอก และเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเป็นโรค} = \frac{\text{จำนวนต้นกล้าเป็นโรค}}{\text{จำนวนต้นกล้าทั้งหมด}} \times 100$$

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการ

1. แปลงปลูกแตงโมและเมลอนของเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง

2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคผลเน่าของพืชสกุลแตงจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก

เก็บตัวอย่างใบและผลของแตงโมและเมลอนที่แสดงอาการโรคผลเน่า จากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกในท้องที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัด ขอนแก่น อุดรธานี กาฬสินธุ์ มุกดาหาร อุบลราชธานี สกลนคร ภาคเหนือ คือ ลำปางและน่าน ภาคกลาง คือ กาญจนบุรี จำนวน 47 แปลง โดยเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นมีอาการที่สงสัยว่าเป็นโรคผลเน่า ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ลักษณะของผลแตงโมที่มีอาการโรคผลเน่า คือ ผิวของผลเป็นแผลแตกสีน้ำตาล และแสดงอาการฉ่ำน้ำบริเวณรอบแผล เมื่อตัดดูภายในเนื้อผลมีอาการฉ่ำน้ำสีน้ำตาล แต่เนื้อผลไม่เน่าเละ และไม่มีกลิ่นเหม็นเน่า และอาการที่เกิดบนใบแตงโมที่เก็บตัวอย่างมาทดสอบ คือ บริเวณเส้นกลางใบ และเส้นแขนงของใบมีอาการฉ่ำน้ำ หรือเป็นรอยสีน้ำตาลขอบแผลหยักตามเส้นใบ (ภาพที่ 1)

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

จากการนำตัวอย่างผลของแตงโมที่แสดงอาการโรคผลเน่ามาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ได้ 5 ไอโซเลท เป็นเชื้อจากจังหวัดขอนแก่น จำนวน 4 ไอโซเลท คือ 51KK1, 51KK2, 51KK3 และ 51KK4 และแยกเชื้อจากผลเน่าของจังหวัดกาญจนบุรี ได้เชื้อ จำนวน 1 ไอโซเลท คือ 51KJ1 และจากการอนุเคราะห์เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยก

ได้จากแตงโม (WMKK) ซึ่งทุกไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีสีขาวใส กลม ขอบเรียบ นูนเนื้อผิวหน้าอาหาร ขนาดเล็ก และเจริญได้ช้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อที่สงสัยในพืชสกุลแตง

การทดสอบการเกิดโรคบนพืชทั้ง 4 ชนิดได้แก่ แตงโม แตงกวา เมลอน และฟักทอง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 51KJ1 ไม่สามารถทำให้เกิดอาการใดๆ บนใบเลี้ยงของพืชทดสอบทั้ง 4 ชนิด แต่แบคทีเรียไอโซเลท 51KK1, 51KK2, 51KK3 และ 51KK4 ทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำทั้งบนใบและใต้ใบเลี้ยงของพืชทดสอบ ทั้ง 4 ชนิด แต่ต้นแตงโมและแตงกวาเนื้อใบยุบตัว และต้นฟักทองเนื้อใบเน่าฉีกขาด ส่วนอาการฉ่ำน้ำของใบเมลอนลามไปถึงใบจริงและยอดหักพับ ส่วนชุดควบคุมไม่เกิดอาการผิดปกติกับใบเลี้ยงที่ฉีดน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 2)

ส่วนการทดสอบการเกิดโรคบนพืช 5 ชนิด ได้แก่ บวบเหลี่ยม แตงโม แตงกวา เมลอน และฟักทอง กับเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยกได้จากแตงโม (WMKK) พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถทำให้พืชทดสอบทั้ง 5 ชนิด เกิดอาการรอยฉ่ำน้ำบริเวณที่ปลูกเชื้อบนใบเลี้ยงหลังจากปลูกเชื้อและคลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนต้นพืชทดสอบที่ฉีดด้วยชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ) ใบเลี้ยงเป็นปกติ (ภาพที่ 3)

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของพืชสกุลแตง

4.1 การตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค direct ELISA

จากการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่มีอาการคล้ายโรคผลเน่าจากแปลงปลูกจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดขอนแก่น ด้วยเทคนิค indirect ELISA ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ 51KJ1, 51KK1, 51KK2, 51KK3 และ 51KK4 ให้ปฏิกิริยาไม่เกิดสีเหลือง ซึ่งให้ผลเป็นลบ แสดงว่าไม่เป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ให้ปฏิกิริยาเกิดสีเหลือง ซึ่งให้ผลเป็นบวก แสดงว่าเป็นเชื้อสาเหตุโรคผลเน่า

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรีย

จากการทดสอบคุณสมบัติของชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า เชื้อไอโซเลท 51KK1, 51KK2, 51KK3 51KK4 และ 51KJ1 ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ

4.2.1. ความสามารถในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) พบว่า ให้ผลเป็นลบ เพราะไม่สามารถย่อยแป้งได้บนอาหาร yeast extract nutrient agar (YNA)

4.2.2. ปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase reaction) พบว่าให้ผลเป็นลบ เนื่องจากไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดส บนแผ่นกระดาษ tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.2.3. การสร้างสารเรืองแสง (Fluorescent pigment production) พบว่าให้ผลเป็นบวก เนื่องจากเกิดการสร้างสารเรืองแสงบนอาหาร King's medium B

4.2.4. การไฮโดรไลด์ arginine (Arginine hydrolase activity) พบว่าให้ผลเป็นบวก เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาสีไฮโดรไลด์ เนื่องจากสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนีย

4.2.8 การสร้าง Levan (Levan production) พบว่าให้ผลเป็นบวก คือ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เจริญบนอาหารมีลักษณะสีขาว นูน และเป็นเมือกเยิ้มบนอาหาร nutrient sucrose agar

4.2.9 ปฏิกิริยาไลโปโลติต (Lypolytic activity) พบว่าให้ผลเป็นลบ เนื่องจากแบคทีเรียทดสอบสามารถสร้างฝ้าสีขาวบนอาหาร tween 80 agar การรีดิวซ์ในเตรท (Nitrate reduction)

ส่วนเชื้อแบคทีเรียได้จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และเชื้อแบคทีเรียจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้ผลตรงข้ามกับเชื้อแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทข้างต้น

5. การทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในพืชสกุลแตงบางชนิด

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยสารเคมีชนิดต่างๆ พบว่า สารที่ให้ลักษณะของวงใสมากที่สุด คือ สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ขนาดวงใสเท่ากับ 1.14 เซนติเมตร รองลงมา คือ สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.09 เซนติเมตร และ สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และสารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.09, 0.97 และ 0.51 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่เกิดขึ้นกับการทดสอบของสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ที่

ความเข้มข้น 5.0 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จะสังเกตเห็นส่วนขุ่นเกิดขึ้นบริเวณรอบกระดาษกรองทดสอบ และจึงเกิดวงใสล้อมรอบ ซึ่งต้องนำสารนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในเมล็ดพันธุ์เพื่อดูผลที่เกิดขึ้นอีกครั้ง ส่วนในการทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกับกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.16, 0.22 และ 0.39 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่สารเคมีที่ไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ คือ สารโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์, สารโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ และสารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่เกิดวงใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) (ตารางที่ 1, ภาพที่ 4)

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

5.2.1 การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม

จากการทดสอบการถ่ายทอดโรคผลเน่ากับเมล็ดพันธุ์แตงโม โดยการนำเมล็ดพันธุ์แตงโมเขย่าในเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในอาหาร Nutrient Broth ที่ระยะเวลาต่างๆ หลังจากนั้นนำเมล็ดพันธุ์แตงโมไปปลูกในดินเพื่อสังเกตอาการของต้นแตงโม พบว่า การปลูกเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโมเป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์การงอกสูงที่สุด คือ 98 เปอร์เซ็นต์ และต้นกล้าแตงโมเป็นปกติ รองลงมาคือการปลูกเชื้อแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าต้นกล้าของแตงโม บริเวณใบเลี้ยงเกิดอาการฉ่ำน้ำ เนื้อใบยุบตัว มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 33.33 เปอร์เซ็นต์ และการปลูกเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดแตงโมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคมากที่สุด คือ 68.97 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำใบที่เกิดอาการไปตรวจด้วยเทคนิค ELISA พบว่าให้ผลเป็นสีเหลือง (เป็นผลบวก) ส่วนชุดควบคุมไม่พบอาการใบเลี้ยงฉ่ำน้ำ (ตารางที่ 2)

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม หลังจากปลูกเมล็ดแตงโมทดสอบในโรงเรือน พบว่าเมล็ดพันธุ์แตงโมมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงที่สุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดด้วยสารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ) มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ กรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นแตงโมเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลเปอร์เซ็นต์ความงอกใกล้เคียงกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่เขย่าในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง และเมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยสารเบนซอลโค

เนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดด้วยสารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากันกับเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว มีค่าเท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์ แต่เมล็ดพันธุ์แตงโมที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความงอกเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์มีความเข้มข้นสูง ทำให้เป็นพิษกับเมล็ดพันธุ์แตงโมก่อให้เกิดการตายของเมล็ดพันธุ์ได้ (ตารางที่ 3)

ผลจากการสังเกตอาการของใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมที่เพาะในโรงเรือนเป็นเวลา 14 วัน พบว่า สารเคมีที่ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม คือ สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ), สารเพอร๊อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบอาการฉ่ำน้ำที่ใบเลี้ยงของต้นแตงโมเลย (ภาพที่ 5ก) เช่นเดียวกับชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด คือ เมล็ดพันธุ์แตงโมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง และเมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ ส่วนต้นแตงโมที่กำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยสารเบน-ซอลโคเนียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมแสดงอาการฉ่ำน้ำเนื้อใบยุบตัว 39.51 และ 46.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้แสดงว่าการทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เห็นลักษณะขุ่นบริเวณรอบของกระดาษกรอง อาจเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ เมื่อนำมาทดสอบการกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนเมล็ดพันธุ์ จึงแสดงอาการของโรคเกิดขึ้นกับต้นกล้าแตงโม แสดงให้เห็นว่าสารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้ และต้นกล้าแตงโมที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง พบว่าใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมมีอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัว 56.98 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการล้างด้วยน้ำกลั่นสามารถกำจัดเชื้อแบคทีเรียได้บางส่วน แต่กำจัดไม่ได้ทั้งหมด ส่วนเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว พบว่าใบเลี้ยงมีอาการ ฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัว 93.98 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 5ข) และเมื่อนำใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมที่มีอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัวไปตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวก แสดงว่าใบเลี้ยงที่เกิดอาการมีสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (ตารางที่ 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าจากแปลงเกษตรกรที่ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชสุกลแตงเพื่อการส่งออกของเกษตรกรจากภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 47 แปลง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 5 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ แตงโม เมลอน แตงกวาและ ฟักทอง พบว่า ทุกเชื้อสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและในบางพืชทดสอบต้นกล้าเกิดอาการใบเน่าเละและต้นเหี่ยวทั้งต้น เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและตรวจด้วยเทคนิค ELISA ผลปรากฏว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลทให้ผลเป็นลบ และจากความอนุเคราะห์จากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ให้เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จำนวน 2 ไอโซเลท ทำการทดสอบการเกิดโรคกับพืช 5 ชนิด คือ บวบเหลี่ยม แตงโม แตงกวา เมลอนและ ฟักทอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถทำให้เกิดอาการฉ่ำน้ำและเนื้อใบยุบตัวโดยที่ต้นไม่เน่าเละในทุกพืชทดสอบ ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโม พบว่า สามารถปลูกเชื้อแบคทีเรียกับเมล็ดพันธุ์แตงโมนาน 48 ชั่วโมงได้ผลดี และสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* จากเมล็ดพันธุ์แตงโมให้ได้ผลดี คือ สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 110 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (ตามคำแนะนำ), สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค เข้มข้น 220 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร และกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาให้เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* เพื่อใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และขอขอบพระคุณ ดร. ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ ดร. ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อนุเคราะห์เชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* เพื่อใช้ในการทดสอบการกำจัดด้วยสารเคมี รวมถึงคุณจิรวัฒน์ ไกรนรา ที่ช่วยในการปลูกเมล็ดพันธุ์แตงโมที่ทดสอบในโรงเรือน

เอกสารอ้างอิง

พยอม พินยพงศ์. 2537. รายงานครั้งแรกของโรคผลเน่า (Bacterial fruit blotch) ของแตงโมในประเทศไทย. แก่นเกษตร 22 : 55-57.

เพชรรัตน์ ศิริวงศ์ และ ประภาษ กาวิชา. 2543. โรคเน่าแตงโมของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย. รายงานสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2543. วันที่ 24-25 มกราคม 2543 ณ หอประชุมกวี จุติกุล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศรีวิเศษ เกษสังข์. 2548. ผลงานฉบับเต็ม. ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตร 8ว. กลุ่มงานวิชาการกักกันโรคพืช กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-16.

Babadoost, M., and Pataky, N. 2002. First Report of Bacterial Fruit of Watermelon Caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Illinois. Plant Dis. 86:443.

Crall, J.M. and N.C. Schenck. 1969. Bacterial fruit rot of watermelon in Florida. Plant Dis. Rep. 53:74-75.

Evans, T.A., and R. P. Mulrooney. 1991. First report of watermelon fruit blotch in Delaware. Plant Dis. 73: 1074.

Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. Plant Dis. 77: 1090-1092.

Hopkins, D.L., J.D. Cucuzza and J.C. Watterson. 1996. Wet seed treatments for the control of bacterial fruit blotch of watermelon. Plant Dis. 80: 529-532.

Isakeit, T., M.C. Black, L.W. Barnes and J.B. Jones. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Dis. 81: 694.

Pinyapong, P.S. 1994. Etiology and factors affecting the development of fruit blotch of watermelon (*Citrullus lanatus* (Thumb.) Matsum&Nakai) in Northeastern Thailand. M.S. Thesis. University of the Philippines at Los Banos. 99.

Rane, K.K. and R.X. Latin 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon : association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76: 509-512.

Schaad, N.W., Sowell, G,Jr Goth, R.E., Colwell, R.R., and Webb,R.E.1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacterial. 28:117-125.

Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson.1991. Occurrence of bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

Sowell, G., Jr. and Schaad, N. W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligens* subsp. *citrulli* on watermelon seed transmission and resistance of plant interactions. Plant Dis. Rep. 63: 437-441.

Wall, G.C. 1989. Control of watermelon fruit blotch by seed heat treatment. Phytopathology. 79: 1191.

Webb, R.E., and Goth, R.W. 1965. A seed-borne bacterium isolated from watermelon. Plant Dis. Rep. 49:818-821.

Zitter, T.A., Hopkins, D.L, and Thomas, C.E. 1996. Bacterial fruit blotch in Compendium of Cucurbit Disease. The America Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota . 34-35 p.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ของสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

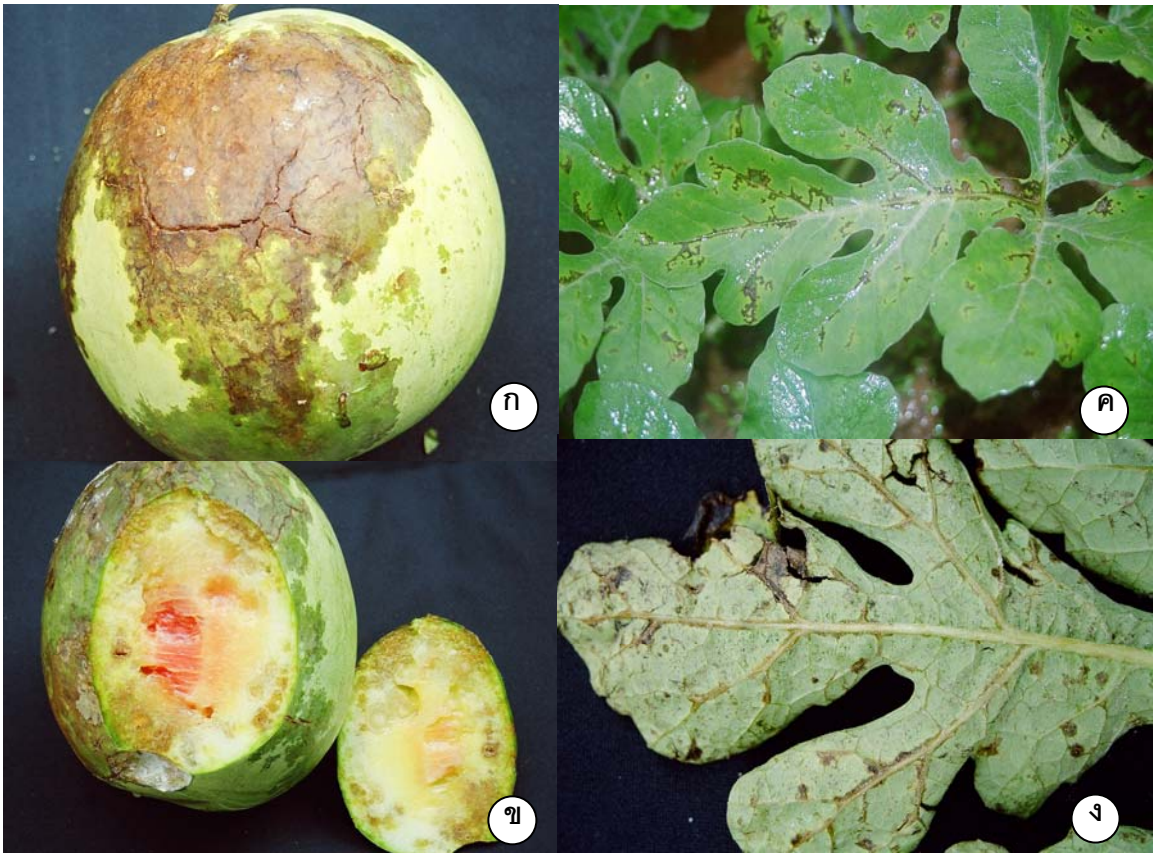
ชนิดของสารเคมี	**ความเข้มข้น**	**ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญ ของ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (เซนติเมตร)**
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 37%	0.5 เปอร์เซ็นต์	0.16
	1.0 เปอร์เซ็นต์	0.22
	2.0 เปอร์เซ็นต์	0.39
สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride)	2.5 เปอร์เซ็นต์	0.78
	5.0 เปอร์เซ็นต์	1.14
	10.0 เปอร์เซ็นต์	1.09
สารโซเดียมเบนโซเอท (Sodium Benzoate)	1.0 เปอร์เซ็นต์	0.00
	5.0 เปอร์เซ็นต์	0.00
	10.0 เปอร์เซ็นต์	0.13
สารเพอร์อกซี่อะซิติกเอสิค (Tsunami 100) 220 ml/H2O 2 l.	เข้มข้นน้อยกว่า ½ ของคำแนะนำ	0.33
	คำแนะนำ	0.51
	Tsu เข้มข้นมากกว่า 2 เท่าของคำแนะนำ	0.97
สารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ (Sodium hypochloride) เข้มข้น 5.25% w/w	0.5 เปอร์เซ็นต์	0.00
	1.0 เปอร์เซ็นต์	0.17
	2.0 เปอร์เซ็นต์	0.31
ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	-	0.00

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม ที่ระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโม	**เปอร์เซ็นต์ความงอก**	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
ปลูกเชื้อนาน 12 ชั่วโมง	98	0.00
ปลูกเชื้อนาน 24 ชั่วโมง	90	33.33
ปลูกเชื้อนาน 48 ชั่วโมง	87	68.97

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* กับเมล็ดพันธุ์แตงโม

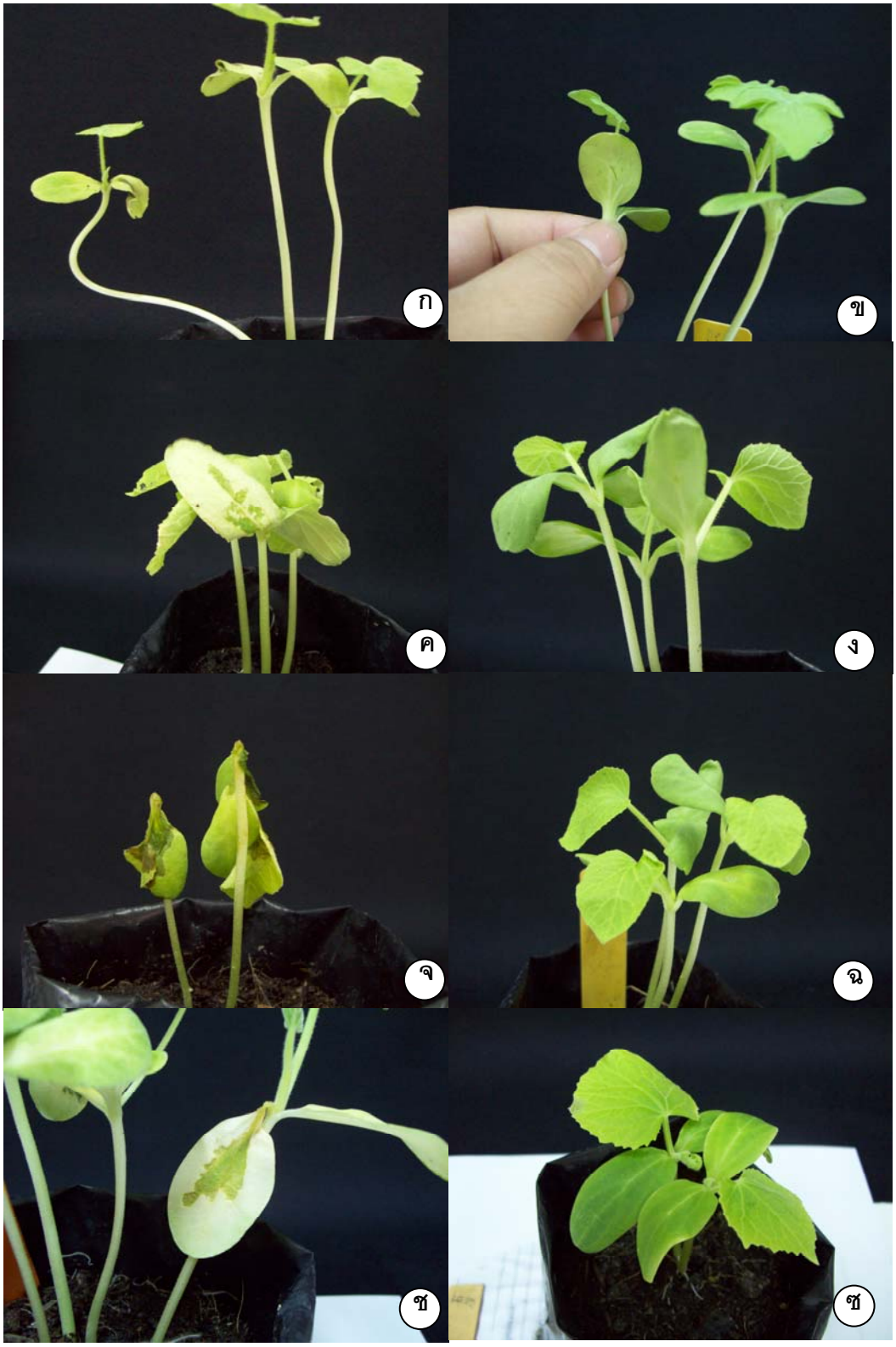
ชนิดของสารเคมี	**ความเข้มข้น**	**เปอร์เซ็นต์ความงอก**	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์	2.0 เปอร์เซ็นต์	95	0
สารเบนซอลโคเนียมคลอไรด์ (Benzalkonium Chloride)	2.5 เปอร์เซ็นต์	88	39.77
	5.0 เปอร์เซ็นต์	86	46.51
	10.0 เปอร์เซ็นต์	6	100
สารเพอร็อกซี่อะซิติกเอสิด (Tsunami 100) 220 มิลลิลิตร/น้ำ 2 ลิตร	คำแนะนำ	97	0
	เข้มข้นมากกว่า 2 เท่า ของคำแนะนำ	86	0
เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้ออย่างเดียว	-	83	93.98
เมล็ดพันธุ์แตงโมที่ปลูกเชื้อแล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง	-	86	56.98
เมล็ดพันธุ์แตงโมที่แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง	-	100	0
เมล็ดพันธุ์แตงโมปกติ	-	98	0



ภาพที่ 1 ลักษณะของอาการโรคผลเน่าสาเหตุเกิดจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

ก) ลักษณะอาการบริเวณเปลือกของผลแตงโม ข) เมื่อตัดดูภายในเนื้อผลมีอาการฉ่ำน้ำสีน้ำตาลบน

ค) ลักษณะอาการฉ่ำน้ำบริเวณเส้นบนใบของต้นแตงโม ง) ลักษณะอาการฉ่ำน้ำบริเวณเส้นใต้ใบของต้นแตงโม



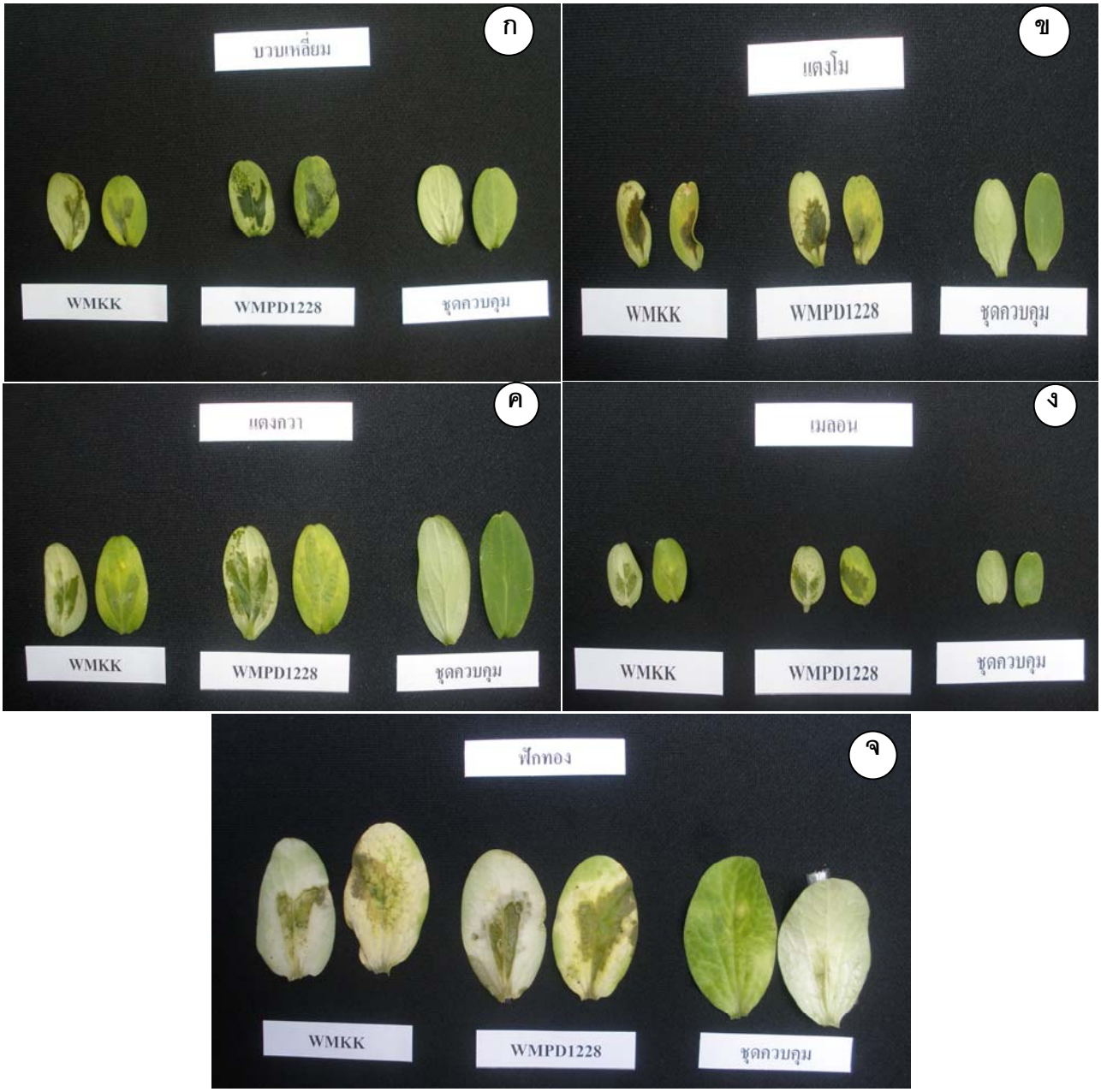
ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของต้นพืชชนิดต่างๆ เมื่อทำการปลูกเชื้อทดสอบ

ก) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโมที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ข) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโมที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

ค) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงกวาที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ง) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงกวาที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

จ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าเมลอนที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ฉ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าเมลอนที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

ช) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าฟักทองที่ทำการปลูกเชื้อทดสอบ ซ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าฟักทองที่ทำการฉีดน้ำกลั่นฆ่า

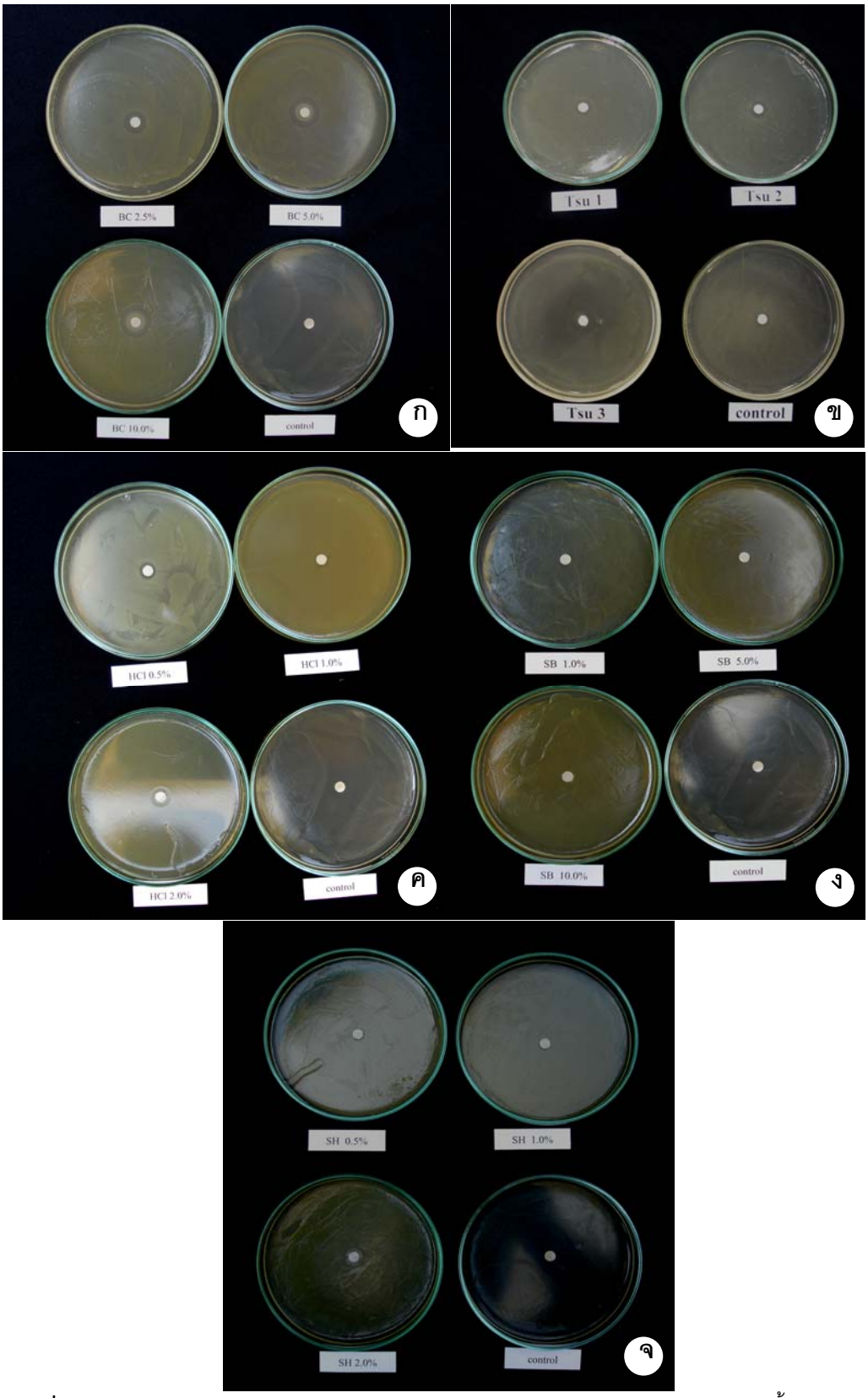


ภาพที่ 3 ลักษณะอาการของใบเลี้ยงของต้นพืชทดสอบชนิดต่างๆ เมื่อทำการปลูกเชื้อแบคทีเรียจากกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่แยกได้จากแตงโม (WMPD1228) และเชื้อแบคทีเรียจากภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่แยกได้จากแตงโม (WMKK) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ก) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าบวบเหลี่ยม ข) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงโม

ค) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าแตงกวา ง) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าเมลอน

จ) อาการของใบเลี้ยงต้นกล้าฟักทอง



ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ ในการกำจัดเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ก) การทดสอบสารเบนซอลโคเนียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ข) การทดสอบสารเพอร็อกซี่อะซิกเอสิคที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ค) การทดสอบกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ง) การทดสอบสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

จ) การทดสอบสารโซเดียมไฮโปรคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับชุดควบคุม

ภาพที่ 5 ลักษณะใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโม

ก) ลักษณะใบเลี้ยงปกติ

ข) อาการเนื้อฉ่ำน้ำ เนื้อใบยุบตัวที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* บนต้นกล้าแตงโม

การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของรา *Guignardia citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ

Surveillance and Distribution of *Guignardia citricarpa* Caused Black Spot Disease of Pummelo

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ชนินทร ดวงสอาด
ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจติดตามการระบาดของโรคจุดดำของส้มโอในเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2551 ในแปลงที่ 1 อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พบโรคที่ใบในเดือนตุลาคม 2550 – มิถุนายน 2551 และพบโรคที่ผลในเดือนพฤษภาคม –กันยายน โดยมีความรุนแรงของโรค 15, 15, 33, 36 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในแปลงที่ 2 อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พบโรคที่ใบในเดือนพฤศจิกายน 2550 – กุมภาพันธ์ 2551 และพบโรคที่ผลในเดือนพฤษภาคม –กันยายน โดยมีความรุนแรงของโรค 5, 5, 65, 66 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในแปลงที่ 1 อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม พบโรคที่ใบในเดือนมกราคม – มิถุนายน 2551 และพบโรคที่ผลในเดือนกรกฎาคม – กันยายน โดยมีความรุนแรงของโรค 10, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในแปลงที่ 2 อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม พบโรคที่ใบในเดือนตุลาคม 2550 – มีนาคม 2551 และพบโรคที่ผลในเดือนมิถุนายน –กันยายน โดยมีความรุนแรงของโรค 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากการสำรวจติดตามการระบาดของโรคจุดดำของส้มโอ ระหว่างดือนตุลาคม 2551 – กันยายน 2552 ทำการสำรวจโรคจุดดำจำนวน 3 แปลง ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ในแปลงที่ 1 พบโรคที่ใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 2, 0, 0, 0, 0, 5, 5, 0, 0, 5, 15, 15 เปอร์เซ็นต์ และพบโรคที่ผลใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 7, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแปลงที่ 2 พบโรคที่ใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 10, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 10, 15, 0 เปอร์เซ็นต์ และพบโรคที่ผลใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 20, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 5, 5, 10, 15, 0

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-01-01-01-51

เปอร์เซ็นต์ ส่วนแปลงที่ 3 พบโรคที่ใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 10, 10, 0, 0, 0, 0, 0, 10, 10, 10, 10, 10 เปอร์เซ็นต์ และพบโรคที่ผลใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 40, 50, 0, 0, 2, 1, 8, 10, 10, 10, 10, 20 เปอร์เซ็นต์

สำรวจสถานการณ์โรคจุดดำพบการระบาดของโรคจุดดำที่จังหวัดสมุทรสงคราม ราชบุรี ตราด เชียงราย เชียงใหม่ ชุมพร นครศรีธรรมราช และสงขลา ระหว่างเดือนสิงหาคม 2550 – พฤศจิกายน 2551 พบโรคจุดดำบนส้มโอพันธุ์ทองดี ที่อำเภอนครชัยศรี อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม อำเภอบางคณฑี จังหวัดสมุทรสงคราม อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอเกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย อำเภอเมือง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบโรคจุดดำบนส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ และพวงชมภู ที่ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พันธุ์จ้าวเสวย พบโรคจุดดำที่อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร และพันธุ์ทับทิมสยาม พบโรคจุดดำที่อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

คำนำ

ราสกุล *Guignardia* Viala & Ravaz อยู่ใน Class Ascomycetes, Order Sphaeropsidales, Family Mycosphaerellaceae มีรา *Phyllosticta* Pers เป็น Anamorphic state อยู่ใน Class Coelomycetes ส่วนใหญ่ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืช conidia มี 1 เซลล์ นอกจากอยู่บนใบพืชแล้วรายังเจริญอยู่บนกิ่ง ลำต้นของพืชด้วย รา *Guignardia* เป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ โรค Black spot ของพืชตระกูลส้มสาเหตุเกิดจาก *Guignardia citricarpa* (anamorphic state: *Phyllosticta citricarpa*) (Kiely, 1949; Sutton and Waterston, 1966) โรค Black rot ขององุ่น สาเหตุเกิดจาก *Guignardia bidwelli* (anamorphic state: *Phyllosticta ampelicida*) (Sivanesan and Holliday, 1981) โรคใบจุดของกล้วยสาเหตุเกิดจาก *Guignardia musae* (anamorphic state: *Phyllosticta musarumi*) (Punithalingam and Holliday, 1975)

นอกจากราสกุลนี้เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์เจริญอยู่บนใบพืชที่ปกติโดยเฉพาะโรค Black spot ของพืชส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก *G. citricarpa* แต่มักพบรา *G. mangiferae* ด้วยแต่พบว่าราดังกล่าวไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคพืช (Glienke-Blanco และคณะ, 2002; Baayen และคณะ, 2002) ดังนั้นการศึกษาลักษณะต่างของราเพื่อจำแนกชนิดนั้นเป็นสิ่งที่สำคัญและจะทำการพิสูจน์การเกิดโรคของราแต่ละชนิดด้วยเพื่อยืนยันว่ารานั้นเป็นสาเหตุของโรคหรือไม่ใช่สาเหตุของโรค การจำแนกราสกุลนี้ในระดับ species โดยศึกษาลักษณะ morphological characters นั้น จะเห็นได้ว่าลักษณะของราทาง morphological characters จะไม่แตกต่างกัน

อย่างเด่นชัด ซึ่งชนิดของราอาจจะมีความสัมพันธ์กับพืชอาศัย รา *Phyllosticta* ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชอาจมีความแตกต่างกับราที่อาศัยอยู่บนใบพืชที่ร่วงอยู่บนพื้นดิน การจำแนกราสกุลนี้นอกจากใช้ลักษณะทาง morphological characters แล้วก็ยังใช้ข้อมูลทางนิเวศวิทยาของเชื้อมาประกอบการจำแนก ดังนั้นจึงต้องทำการสำรวจการสถานการณ์โรค black spot ในประเทศไทย และศึกษาการจำแนกรา *Guignardia citricarpa* ที่เป็นสาเหตุโรค black spot และ *Guignardia mangiferae* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ เพื่อให้ได้ข้อมูลของเชื้อได้แก่ ชนิดชองเชื้อ (species) ลักษณะประจำสายพันธุ์ และเขตแพร่ระบาด จะเป็นข้อมูลและเป็นประโยชน์ต่อการส่งออกส้มโอไปยังต่างประเทศ

ราสาเหตุของโรคจะชอบเข้าทำลายในสภาพอากาศร้อนชื้นโดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อน ซึ่งสภาพอากาศดังกล่าวเป็นลักษณะภูมิอากาศของประเทศที่ปลูกพืชตระกูลส้มในแถบ Southeast Asia, Africa, South America, Australia ระยะที่ผลอ่อนแอต่อการเข้าทำลายคือช่วงที่ผลมีอายุ 4-5 เดือนแต่จะไม่แสดงอาการของโรคจนผลกระทั่งส้มอายุใกล้เก็บเกี่ยว มีการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ความชื้นที่ใบ และปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ ที่มีผลต่อการเกิดการปล่อยและการงอกของ ascospores มากมาย (Pinkerton และคณะ, 1998; Hartman และคณะ, 1999; MacHardy และคณะ, 2001; Mondal และ Timmer, 2002; Renato และคณะ, 2006) ปัจจัยต่าง ๆ นี้มีความสำคัญต่อการเกิดและระบาดของโรค ดังนั้นข้อมูลเหล่านี้สามารถนำใช้ในการควบคุมโรคที่เหมาะสมต่อไป เนื่องจากโรค black spot มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก มีรายงานพบโรคนี้ในทุกแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มใน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกา อเมริกาใต้ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ แต่ยังไม่มีรายงานพบในสหภาพยุโรป (European Union, 2000) และสหรัฐอเมริกา (Kotzé, 1981) โรคนี้จึงจัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกา การนำเข้าส้มทั้งสองแหล่งนี้ต้องปลอดโรค black spot

วิธีดำเนินการ

วิธีการ

1. กำหนดแปลงทดลองที่จะทำการสำรวจการแพร่กระจายของโรค black spot ทั้งหมด 4 แปลง ได้แก่ แปลงส้มโออำเภอนครชัยศรีและอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และแปลงส้มโอจำนวน 2 แปลง ในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

2. สำรวจการแพร่กระจายของโรค black spot ของส้มโอ จากแปลงส้มโอ 4 แปลง ได้แก่ แปลงส้มโออำเภอนครชัยศรีและอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และแปลงส้มโอจำนวน 2 แปลง ในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย โดยสุ่มตรวจต้นส้มโอที่เป็นโรคอย่างมีแบบแผนแต่ละแปลง กำหนดตรวจ 1 ต้น เว้น 3 ต้น ประเมินการเกิดโรค

3. รวบรวมสรุปข้อมูลการแพร่กระจายของโรค black spot ของส้มโอ

เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น – สิ้นสุด**

ตุลาคม 2550 – กันยายน 2553

สถานที่ - แปลงส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย 2 แปลง

- แปลงส้มโอ อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม 1 แปลง
- แปลงส้มโอ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม 1 แปลง
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

กำหนดแปลงส้มโอที่จะทำการสำรวจและประเมินความรุนแรงของโรคจุดดำของส้มโอในอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 2 แปลง และที่จังหวัดนครปฐม 2 แปลง ได้แก่ อำเภอนครชัยศรีและอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม

<u>การสำรวจระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – ตุลาคม 2551</u>

แปลงที่ 1 อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

พบโรคที่ใบในเดือนตุลาคม 2550 – มิถุนายน 2551 และพบโรคที่ผลในเดือนพฤษภาคม – กันยายน โดยมีความรุนแรงของโรค 15, 15, 33, 36 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

แปลงที่ 2 อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

พบโรคที่ใบในเดือนพฤศจิกายน 2550 – กุมภาพันธ์ 2551 และพบโรคที่ผลในเดือนพฤษภาคม –กันยายน โดยมีความรุนแรงของโรค 5, 5, 65, 66 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

<u>การสำรวจระหว่างเดือนตุลาคม 2551 – ตุลาคม 2552</u>

จากการสำรวจติดตามการระบาดของโรคจุดดำของส้มโอ ระหว่างดือนตุลาคม 2551 – กันยายน 2552 ทำการสำรวจโรคจุดดำจำนวน 3 แปลง ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ในแปลงที่ 1 พบโรคที่ใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 2, 0, 0, 0, 0, 5, 5, 0, 0, 5, 15, 15 เปอร์เซ็นต์ และพบโรคที่ผลใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 7, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 เปอร์เซ็นต์ สำหรับแปลงที่ 2 พบโรคที่ใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 10, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 10, 15, 0 เปอร์เซ็นต์ และพบโรคที่ผลใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 20, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 5, 5, 10, 15, 0

เปอร์เซ็นต์ ส่วนแปลงที่ 3 พบโรคที่ใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 10, 10, 0, 0, 0, 0, 0, 10, 10, 10, 10, 10 เปอร์เซ็นต์ และพบโรคที่ผลใบโดยมีความรุนแรงของโรคดังนี้ 40, 50, 0, 0, 2, 1, 8, 10, 10, 10, 10, 20 เปอร์เซ็นต์

สำรวจสถานการณ์โรคจุดดำพบการระบาดของโรคจุดดำที่จังหวัดสมุทรสงคราม ราชบุรี ตราด เชียงราย เชียงใหม่ ชุมพร นครศรีธรรมราช และสงขลา ระหว่างเดือนสิงหาคม 2550 – พฤศจิกายน 2551 พบโรคจุดดำบนส้มโอพันธุ์ทองดี ที่อำเภอนครชัยศรี อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม อำเภอบางคณฑี จังหวัดสมุทรสงคราม อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอเกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย อำเภอเมือง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบโรคจุดดำบนส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ และพวงชมภู ที่ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พันธุ์จ้าวเสวย พบโรคจุดดำที่อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร และพันธุ์ทับทิมสยาม พบโรคจุดดำที่ อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

พบการระบาดของโรคจุดดำของส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2552 และสำรวจสถานการณ์โรคจุดดำพบการระบาดของโรคจุดดำที่จังหวัดสมุทรสงคราม ราชบุรี ตราด เชียงราย เชียงใหม่ ชุมพร นครศรีธรรมราช และสงขลา ระหว่างเดือนสิงหาคม 2550 – พฤศจิกายน 2551 พบโรคจุดดำบนส้มโอพันธุ์ทองดี ที่อำเภอนครชัยศรี อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม อำเภอบางคณฑี จังหวัดสมุทรสงคราม อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอเกาะช้าง จังหวัดตราด อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย อำเภอเมือง อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดชุมพร อำเภอสิชล จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา พบโรคจุดดำบนส้มโอพันธุ์ขาวใหญ่ และพวงชมภู ที่ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย พันธุ์จ้าวเสวย พบโรคจุดดำที่อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร และพันธุ์ทับทิมสยาม พบโรคจุดดำที่ อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

Baayen, R. ,P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., Weerdt, M., van Brouweeershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni, W.,Jr., Glienke de Blanco, C., and Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitant endophyte bof woody plants, G. *mangifera* (*Phyllosticta* capitalensis). Phytopathology 92:264-477

Bonants, P.J.M., G.C. Carroll, M. de Weerdt, I R van Brouwershaven and R.P. Baayen. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*/ European Journal of Plant Pathology, 109: 503-513.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006a. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. Plant Pathology 55: 194-199.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006b. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. New Zealand Plant Protection 59: 141-145.

Glienke-Blanco, C., Carlos Ivan Aguilar-Vidoso, Maria LÚcia Carneiro Vieira, Paulo Augusto Vianna Barroso and João LÚcio Azevedo. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. Genetics and Molecular Biology, 25 (2): 251-255.

Gonzlez, M. S. and Rondn. 2005. First Report of *Guignardia psidii*, an Ascigerous State of *Phyllosticta psidiicola*, Causing Fruit Rot on Guava in Venezuela. Plant Dis. 89:773

Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. Agricultural Gazette of New South Wales 60: 17-20.

Kotzé, J., M., 2000. Black spot. Pages 23-25 in : Compendium of Citrus Diseases 2nd ed. L.W.Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul,MN.

Meyer, G. M., Sanders, R. Jacobs, and L. Korsten. 2006. A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. Plant Dis. 90:97-101.

Punithalingam, E and Holliday, P. 1975. *Guignardia musae*. No. 467 *In:* CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Sivanesan, A and P. Holliday. 1981. *Guignardia bidwelli*. No. 710 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, U.K.

Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Van der Aa HA. 1973. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology 5, 110pp.

ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของเชื้อรา *Guignardia citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ : การเข้าทำลายของรา *Guignardia citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ

Biology and Ecology of *Guignardia citricarpa*, the Pomelo Black Spot Pathogen : Infection Period of *Guignardia citricarpa*, the Pomelo Black Spot Pathogen

นางสาวสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ นางสาวพรพิมล อธิปัญญาคม
นางสาวศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช นางสาวชนินทร ดวงสะอาด
นางสาวธารทิพย ภาสบุตร
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการทดลอง เพื่อให้ทราบช่วงเวลาการเข้าทำลายผลส้มโอของรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำ โดยทดลองกรรมวิธีต่างๆ คือ เปิดถุงห่อผลเพื่อให้เชื้อรามีโอกาสได้เข้าสู่ผล เมื่อผลส้มโออายุ 0 15 30 45 60 75 90 105 วัน กรรมวิธีควบคุมที่ห่อผลตลอดเวลาการทดลอง และกรรมวิธีที่ไม่ห่อผล ผลการประเมินการเกิดโรคจุดดำบนผลส้มโอ หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ในปีที่1 (พ.ศ. 2551) พบว่า กรรมวิธีที่ 5 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 60 วัน และกรรมวิธีที่ 10 ไม่ห่อผลส้มโอ พบการเกิดโรค 2 และ 70 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเฉลี่ย ระดับ 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆไม่พบการเกิดโรค และในปีที่2 (พ.ศ. 2552) พบว่า กรรมวิธีที่ 1 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 0 วัน กรรมวิธีที่ 2 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 15 วัน กรรมวิธีที่ 5 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 60 วัน และกรรมวิธีที่ 10 ไม่ห่อผลส้มโอ พบการเกิดโรค 5 1 2 และ10 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเฉลี่ย ระดับ 1 1 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆไม่พบการเกิดโรค สรุปผลการทดลองในเบื้องต้น ได้ว่าเชื้อรา *G. citricarpa* มีโอกาสเข้าทำลายผลส้มโอตั้งแต่กลีบดอกร่วง จนถึงผลส้มโออายุ 60 วัน เพื่อความถูกต้องของผลการทดลองจึงทำการทดลองต่อในปีที่ 3

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-01-01-02-51

คำนำ

โรคจุดดำ (Black spot) ของพืชตระกูลส้ม มีสาเหตุจากรา *Guignardia citricarpa* Kiely (Anamorph: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Van der Aa) ทำให้เกิดแผลบนเปลือกของผลส้ม ถ้าอาการรุนแรงจะเป็นแผลจุดเล็กทั่วทั้งผล อาการของโรคไม่ทำให้ผลส้มเน่าหลังการเก็บเกี่ยว (Kotzé, 1981) แต่จะทำให้ราคาของผลผลิตต่ำลง พันธุ์พืชตระกูลส้มที่ปลูกเป็นการค้ามักอ่อนแอต่อโรคนี้ ได้แก่ มะนาว ส้ม (โดยเฉพาะพันธุ์ Valencia) navel oranges (*C. sinensis* (L.) Osbeck) และ grapefruit (*C. paradise* Macf.) ยกเว้น sour orange (*C. aurantium* L.) และพันธุ์ลูกผสมจะต้านทานต่อโรคนี้ (Kotzé, 1981)

โรคนี้พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1895 ที่ New South Wales ประเทศออสเตรเลียบนส้มพันธุ์ Valencia (Kiely, 1949) และต่อมาพบการแพร่ระบาดในประเทศ South Africa โดยการติดมาจากตาส้มที่นำเข้ามาจากประเทศออสเตรเลีย ปัจจุบันมีรายงานโรคนี้ในทุกแหล่งปลูกพืชตระกูลส้มในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แอฟริกาใต้ อเมริกาใต้ ออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ แต่ยังไม่มีรายงานพบในสหภาพยุโรป (European Union, 2000) และสหรัฐอเมริกา (Kotzé, 1981) โรคนี้จัดเป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศในสหภาพยุโรป

มีการศึกษาพบว่าปัจจัยต่าง ๆ ทางอุตุนิยมวิทยา ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝน ความชื้นที่ใบ และปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ มีผลต่อการเกิด การปล่อย และการงอกของ ascospores ของรา *G. citricarpa* ซึ่งมีความสำคัญต่อการเกิด และระบาดของโรค (Pinkerton *et. al*., 1998 ; Hartman *et. al*., 1999 ; MacHardy *et. al*., 2001 ; Mondal *et. al*., 2002 ; Renato *et. al*., 2006) Renato และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ความชื้นของใบ และปริมาณน้ำฝนต่อการผลิต ascospores ของรา *G. citricarpa* และความรุนแรงของโรคจุดดำของส้มพันธุ์ Valencia (sweet orange) และพันธุ์ Natal ทำการทดลองในสวนส้ม 2 สวน ใน Mogi Guacu ในรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิล ระหว่างเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 2000 –มีนาคม ค.ศ. 2001 โดยการใช้ spore trap พบว่าการผลิต ascospores ของเชื้อรา ทั้งสองสวนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความชื้นของใบ และปริมาณน้ำฝน และพบ ascospores มาก ตั้งแต่ช่วงฤดูใบไม้ผลิจนถึงฤดูร้อนหลังจากมีฝนตกครั้งแรก โดยพบสปอร์มากที่สุดในเดือนมกราคมและกุมภาพันธ์

ในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการศึกษาถึงการเข้าทำลายของเชื้อ รา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษา เพื่อทราบช่วงเวลาการเข้าทำลายผลส้มโอของรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ส้มโอ พันธุ์ทองดี ในแปลงของเกษตรกร อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในแปลงปลูกพืช ได้แก่ ถุงห่อผลไม้ (ถุงรีเมย์) ป้ายเลเบล กรรไกรตัดแต่งกิ่ง เครื่องพ่นสารเคมี และจอบ เป็นต้น

3. สารป้องกันกำจัดโรคพืช และสารฆ่าแมลง

4. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเชื้อรา เช่น เข็มเขี่ย มีดโกน มีดผ่าตัด แผ่นแก้วสไลด์ พร้อมแผ่นปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์

5. กล้องจุลทรรศน์ พร้อมกล้องถ่ายภาพ และฟิล์ม

วิธีการ

1. กำหนดแปลงทดลอง

กำหนดแปลงทดลอง โดยทดสอบกับแปลงส้มโอ พันธุ์ทองดี ที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 1แปลง

2. บันทึกข้อมูลสภาพอากาศ

บันทึกข้อมูลสภาพอากาศ ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด อุณหภูมิต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน และความเร็วลม บริเวณแปลงปลูกส้มโอ ในช่วงเวลาการทดลอง (กุมภาพันธ์ - กันยายน 2551 และ กุมภาพันธ์ – กันยายน 2552)

3. ประเมินการเกิดโรคจุดดำของส้มโอ

เลือกต้นส้มโอที่ออกดอกอายุสม่ำเสมอ จำนวน 20 ต้น เริ่มทำการทดลองหลังจากดอกส้มโอร่วงจากต้นประมาณ ¾ ของดอกส้มโอทั้งหมด หลังจากพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช และแมลงศัตรู เป็นเวลา 1 วัน สุ่มผลส้มโอ จำนวน 400 ผล ห่อผลส้มโอที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซ็นติเมตร ด้วยถุงห่อผลไม้ ขนาด 35 x 50 เซ็นติเมตร หลังจากห่อผลส้มโอ 15 วัน สุ่มเลือกผลส้มโอที่ห่อแล้ว จำนวน 10 ผล จากส้มโอแต่ละต้น เอาถุงห่อผลออก ทิ้งไว้ 15 วัน แล้วนำถุงห่อผลไม้มาห่อใหม่อีกครั้งหนึ่ง พร้อมทั้งติดป้ายชื่อให้สัญลักษณ์ไว้ ทำเช่นนี้ทุก ๆ 15 วัน จนกระทั่งส้มโอใกล้เก็บเกี่ยว

วางแผนการทดลอง แบบ RCB โดยมี10 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ๆ ละ 10 ผล ดังนี้

กรรมวิธีที่1 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 0 วัน (กลีบดอกร่วง)

กรรมวิธีที่2 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 15 วัน

กรรมวิธีที่3 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 30 วัน

กรรมวิธีที่4 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 45 วัน

กรรมวิธีที่5 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 60 วัน

กรรมวิธีที่6 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 75 วัน

กรรมวิธีที่7 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 90 วัน

กรรมวิธีที่8 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 105 วัน

กรรมวิธีที่9 ไม่เปิดถุงห่อผลส้มโอ (กรรมวิธีควบคุม 1)

กรรมวิธีที่10 ไม่ห่อผลส้มโอ (กรรมวิธีควบคุม 2)

ประเมินความรุนแรงของโรคจุดดำของส้มโอ หลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยให้ระดับความรุนแรงของโรคดังนี้

ระดับ 0 ผลส้มโอไม่แสดงอาการโรค

ระดับ 1 เกิดแผลบนผล 1-3 แผล

ระดับ 2 เกิดแผลบนผล 4-6 แผล

ระดับ 3 เกิดแผลบนผลมากกว่า 6 แผล

และคำนวณเปอร์เซ็นต์ผลส้มโอที่เป็นโรค

4. บันทึกผลการทดลอง

บันทึกข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ได้แก่ อุณหภูมิสูงสุด อุณหภูมิต่ำสุด ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน และความเร็วลม บริเวณแปลงปลูกส้มโอ ในช่วงเวลาการทดลอง บันทึกการเกิดโรค หาค่าเฉลี่ยความรุนแรงของการเกิดโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น** ตุลาคม 2550 **สิ้นสุด** กันยายน 2553

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกส้มโอของเกษตรกร อำเภอ เวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการประเมินการเกิดโรคจุดดำบนผลส้มโอ หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ของผลส้มโอที่ทดลองกรรมวิธีต่างๆ คือ เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 0 15 30 45 60 75 90 105 วัน กรรมวิธีควบคุมที่ห่อผลตลอดเวลาการทดลอง และกรรมวิธีที่ไม่ห่อผล ในปีที่1 (พ.ศ. 2551) พบว่า กรรมวิธีที่ 5 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 60 วัน และกรรมวิธีที่ 10 ไม่ห่อผลส้มโอ พบการเกิดโรค 2 และ 70 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเฉลี่ย ระดับ 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆไม่พบการเกิดโรค (ตารางที่ 1) และในปีที่2 (พ.ศ. 2552) พบว่า กรรมวิธีที่ 1 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 0 วัน กรรมวิธีที่ 2 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 15 วัน กรรมวิธีที่ 5 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโอ

อายุ 60 วัน และกรรมวิธีที่ 10 ไม่ห่อผลส้มโอ พบการเกิดโรค 5 1 2 และ10 เปอร์เซ็นต์ และความรุนแรงของโรคเฉลี่ย ระดับ 1 1 1 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีอื่นๆไม่พบการเกิดโรค (ตารางที่ 2)

ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ในช่วงเวลาการทดลองปีที่1 (กุมภาพันธ์ ถึง กันยายน 2551) คือ อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 30.7 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 20.6 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ย 23.8 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 5.7 มิลลิเมตร ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 74 เปอร์เซ็นต์ และความเร็วลมเฉลี่ย 0.51 กิโลเมตร/ชั่วโมง (ตารางที่ 3) และปีที่2 (กุมภาพันธ์ ถึง กันยายน 2552) คือ อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 32.4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 21.4 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ย 26.9 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 8.0 มิลลิเมตร ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 73.5 เปอร์เซ็นต์ และความเร็วลมเฉลี่ย 0.99 กิโลเมตร/ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจุดดำ และระดับความรุนแรงของโรค จากการทดลองปีที่1 (พ.ศ.2551)

กรรมวิธี	% การเกิดโรค	ระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย	หมายเหตุ
กรรมวิธีที่1 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 0วัน	0	-	ทุกกรรมวิธี ผลส้มโอส่วนใหญ่ถูกไรสนิมและเพลี้ยไฟทำลายและบางผลพบราดำ
กรรมวิธีที่2 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 15วัน		-	
กรรมวิธีที่3 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 30วัน	0	-	
กรรมวิธีที่4 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 45วัน	0	-	
กรรมวิธีที่5 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 60วัน	2	1	
กรรมวิธีที่6 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 75วัน	0	-	
กรรมวิธีที่7 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 90วัน	0	-	
กรรมวิธีที่8 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 105วัน	0	-	
กรรมวิธีที่9 ไม่เปิดถุงห่อผลส้มโอ (กรรมวิธีควบคุม 1)	0	-	
กรรมวิธีที่10 ไม่ห่อผลส้มโอ (กรรมวิธีควบคุม 2)	70	3	

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจุดดำ และระดับความรุนแรงของโรค จากการทดลองปีที่ 2 (พ.ศ.2552)

กรรมวิธี	% การเกิดโรค	ระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย
กรรมวิธีที่1 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 0วัน	5	1
กรรมวิธีที่2 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 15วัน	1	1
กรรมวิธีที่3 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 30วัน	0	-
กรรมวิธีที่4 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 45วัน	0	-
กรรมวิธีที่5 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 60วัน	2	1
กรรมวิธีที่6 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 75วัน	0	-
กรรมวิธีที่7 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 90วัน	0	-
กรรมวิธีที่8 เปิดถุงห่อผลออกเมื่อผลส้มโอ อายุ 105วัน	0	-
กรรมวิธีที่9 ไม่เปิดถุงห่อผลส้มโอ (กรรมวิธีควบคุม 1)	0	-
กรรมวิธีที่10 ไม่ห่อผลส้มโอ (กรรมวิธีควบคุม 2)	10	1

ตารางที่ 3 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง กันยายน พ.ศ. 2551

เดือน	อุณหภูมิสูงสุด (°C)	อุณหภูมิต่ำสุด (°C)	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)	ปริมาณฝน (มม.)	ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	ความเร็วลม (กม./ชม.)
ก.พ.-51	28.7	15.7	22.2	1.6	71	0.68
มี.ค.-51	28.6	13.4	21.0	1.0	71	0.42
เม.ย.-51	33.5	22.0	27.8	2.9	71	0.29
พ.ค.-51	31.6	22.8	27.2	4.6	77	1.48
มิ.ย.-51	31.5	23.4	27.5	7.2	79	0.34
ก.ค. 51	30.4	23.4	26.9	12.4	81	0.29
ส.ค.51	30.4	23.4	26.9	10.1	82	0.12
ก.ย. 51	-	-	10.8	-	94.9	0.43
เฉลี่ย	30.7	20.6	23.8	5.7	74	0.51

ตารางที่ 4 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง กันยายน พ.ศ. 2552

เดือน	อุณหภูมิสูงสุด (°C)	อุณหภูมิต่ำสุด (°C)	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)	ปริมาณฝน (มม.)	ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	ความเร็วลม (กม./ชม.)
ก.พ.-52	32.6	14.8	23.7	0.0	65	0.40
มี.ค.-52	33.4	17.5	25.5	1.0	64	0.22
เม.ย.-52	33.6	22.0	27.8	2.5	70	1.28
พ.ค.-52	32.8	23.0	27.9	13.7	75	0.34
มิ.ย.-52	32.8	23.0	27.9	13.7	75	0.34
ก.ค. 52	31.1	23.9	27.5	12.6	79	0.93
ส.ค.52	31.3	23.7	27.5	10.3	81	0.46
ก.ย. 52	31.7	23.2	27.4	10.3	79	3.94
เฉลี่ย	32.4	21.4	26.9	8.0	73.5	0.99

หมายเหตุ ข้อมูลจากสถานีอุตุนิยมวิทยาเชียงราย (กลุ่มงานอากาศเกษตร) อ.เมือง จ.เชียงราย

การทดลองปีที่1 เกิดการระบาดของไรสนิม และเพลี้ยไฟ รวมทั้งพบราดำในระหว่างการทดลอง ซึ่งไรสนิม และเพลี้ยไฟ สามารถเข้าไปในถุงห่อผลได้ ผลส้มโอส่วนใหญ่ของทุกกรรมวิธี จึงถูกไรสนิม และเพลี้ยไฟทำลาย และบางผลพบราดำ ทำให้ไม่เห็นการเกิดโรค ทำให้ไม่สามารถสรุปผลได้ว่า เชื้อรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำ เข้าทำลายผลในช่วงใด ส่วนการทดลองในปีที่2 พบการเกิดในกรรมวิธีที่ 1 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 0 วัน กรรมวิธีที่ 2 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 15 วัน กรรมวิธีที่ 5 เปิดถุงห่อผลเมื่อผลส้มโออายุ 60 วัน และกรรมวิธีที่ 10 ไม่ห่อผลส้มโอ ซึ่งจากผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่าเชื้อรา *G. citricarpa* มีโอกาสเข้าทำลายผลส้มโอตั้งแต่กลีบดอกร่วง จนถึงผลส้มโออายุ 60 วัน เพื่อความถูกต้องของผลการทดลองจึงทำการทดลองต่อในปีที่ 3

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองในเบื้องต้น พบว่าเชื้อรา *G. citricarpa* สามารถเข้าทำลายผลส้มโอตั้งแต่กลีบดอกร่วง จนถึงผลส้มโออายุ 60 วัน เพื่อความถูกต้องของผลการทดลองจึงทำการทดลองต่อในปีที่ 3

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ คุณสุธามาศ ณ น่าน และกลุ่มงานอากาศเกษตร สถานีอุตุนิยมวิทยาเชียงราย อ.เมือง จ.เชียงราย ที่อนุเคราะห์ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา เพื่อใช้ประกอบการวิเคราะห์ผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

European Union. 2000. Special Requirement of Import Plants, Plant Products and Other Object Originating in Third Countries. *Office Journal of European Community*. 169: 44-45.

Hartman, J.R., L, Parisi and P. Bautrais. 1999. Effect of Leaf Wetness Duration, Temperature, and Conidial Inoculum Dose on Apple Scab Infections. *Plant Disease* 83: 531-534.

Kiely, T.B. 1949. Black Spot of Citrus in New South Wales Coastal Orchards. *Agricultural Gazette of New South Wales* 60: 17-20.

Kotzé, J.M. 1981. Epidemiology and Control of Citrus Black Spot in South Africa. *Plant Disease* 65 (12): 945-950.

MacHARDY, W.E., D.M. Gadoury and C. Gessler. 2001. Parasitic and Biological Fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to Disease Management Strategies. *Plant Disease* 85: 1036-1051.

Mondal, S.N. and L.W. Timmer. 2002. Environmental Factors Affecting Pseudothecial Development and Ascospore Production of *Mycosphaerella citri*, the Causal of Citrus Greasy Spot. *Phytopathology* 92: 1267-1275.

Pinkerton, J.N., K.B. Johnson, J.K. Stone and K.L. Ivors. 1998. Factors Affecting the Release of Ascospore of *Anisogramma anomala*. *Phytopathology* 88: 122-128.

Renato F.R., L.W. Timmer and A de Goes. 2006. Effect of Temperatures, Leaf Wetness, and Rainfall on the Production of *Guignardia citricarpa* Ascospores and on Black Spot Severity on Sweet Orange. *Fitopathol. Bras*. 31 (1): 29-34.

การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของรา *Sclerophthora rayssiae* และ *Sclerophthora macrospora* สาเหตุโรคราน้ำค้างของข้าวโพด

Surveillance and Distribution of Corn Downy Mildew Caused by *Sclerophthora rayssiae* and *Sclerophthora macrospora*

พีระวรรณ พัฒนวิภาส บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ทัศนาพร ทัศคร
อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของข้าวโพด และของเชื้อรา ***Sclerophthora rayssiae*** **และ** ***Sclerophthora macrospora*** จากเอกสารวิชาการและเวบไซด์ ได้สำรวจพื้นที่และวางแผนการเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดในพื้นที่ที่มีปลูกข้าวโพดเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2551 จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จ. เชียงราย จ. ตาก จ. นครราชสีมา และจ.สระบุรี สุ่มเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างข้าวโพดจำนวน 2 ครั้งเมื่อข้าวโพดที่อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ และเมื่อข้าวโพดที่อายุประมาณ 7-8 สัปดาห์ ที่ อ. เมือง จังหวัดเชียงรายจำนวน 2 แปลง ที่ อ. แม่ระมาด และ อ. แม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 4 แปลง ที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา จำนวน 3 แปลง อ. มวกเหล็ก จ. สระบุรี จำนวน 1 แปลง ไม่พบเชื้อรา ***Sclerophthora rayssiae*** **และ** ***Sclerophthora macrospore*** สาเหตุโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแปลงเก็บข้อมูล และ ปี พ.ศ. 2552 ได้สำรวจพื้นที่และวางแผนการเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดซ้ำในพื้นที่เดิม ไม่พบเชื้อรา ***Sclerophthora rayssiae*** **และ** ***Sclerophthora macrospore*** สาเหตุโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแปลงเก็บข้อมูล

รหัสการทดลอง 01 01 03 51

คำนำ

โครานำ้ค้างของข้าวโพดมีสาเหตุจากเชื้อรา 3 genus 10 species ได้แก่ *Peronosclerospora sorghi* สาเหตุโรค Sorghum downy mildew เชื้อ *P. maydis* สาเหตุโรค java downy mildew เชื้อ *P. philippinensis* สาเหตุโรค Philippine downy mildew เชื้อ *P. sacchari* สาเหตุโรค Sugarcane downy mildew เชื้อ *Sclerospora graminicola* สาเหตุโรค Graminicola downy mildew หรือ Green ear of pearl millet เชื้อ *Sclerophthora macrospora* สาเหตุโรค Crazy top เชื้อ *S. rayssiae* var. zeae Payak & Renflo สาเหตุโรค Brown stripe downy mildew (Donald, G. W. 2000) ในประเทศไทยมีรายงานโรคราน้ำค้างที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Sclerospora sorghi* สาเหตุโรค sorghum downy mildew เชื้อ *Sclerophthora. rayssiae* var. zeae สาเหตุโรค brown stripe downy mildew (Pitakspraiwan and Piya, 1976) ข้าวโพดที่เป็นโรคราน้ำค้าง brown stripe downy mildew พบใบข้าวโพดมีลักษณะเขียวสลับเขียวอ่อนข้าวโพดที่เป็นโรคนี้จะทำให้ผลผลิตลดลง 20-90% (Payak,1975) เชื้อ *Sclerophthora macrospora* (Shaw CG, *et al*. 1976) เชื้อ *Sclerophthora. rayssiae* var. zeae พบในหลายประเทศได้แก่ เนปาล(Shah. S. M. 1976) อินเดีย และปากีสถาน (Donald, G. W. 2000) *Sclerophthora macrospora* พบในอาฟริกาใต้ (Roth, G. 1967) อเมริกา (Ullstrup A. J. ,1970) ยุโรป และเอเชีย (Donald, G. W. 2000) ข้าวโพดส่วนยอดจะมีใบข้าวโพดเล็กๆแตกออกมา ข้าวโพดที่เป็นโรคนี้ไม่เกิดความเสียหายมาก (Ullstrup A. J. ,1970)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์
2. กรอบไม้อัดตัวอย่างแห้งโรคพืช
3. สไลด์ กระจกปิดสไลด์
4. กล้องจุลทรรศน์
5. lactophenol

วิธีการ

1 สืบค้นข้อมูล

รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของข้าวโพดได้แก่ แหล่งปลูก จำนวนพื้นที่ปลูก พันธุ์ และข้อมูลด้านโรคของข้าวโพดเพื่อกำหนดแปลงที่จะต้องสำรวจเก็บตัวอย่าง ตลอดจนข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับรา *Sclerophthora. rayssiae* และ *Sclerophthora macrospore* เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคราน้ำค้างของข้าวโพด

2 สำรวจและเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดในพื้นที่ปลูกข้าวโพด

กำหนดจุดสุ่มสำรวจในในแปลงปลูกข้าวโพด โดยกำหนดจุดสำรวจ 10 จุด ต่อพื้นที่ 1 ไร่ การเดินสำรวจในแต่ละพื้นที่ที่กำหนดโดยเดินสำรวจแบบ ตัวอักษร W ตามวิธีของ Delp, *et al*. (1986)

3 การเก็บตัวอย่าง

เก็บใบ หรือส่วนของข้าวโพดที่แสดงอาการโรคราน้ำค้าง ถ่ายภาพโรคในสภาพแปลงปลูก สุ่มเก็บตัวอย่างใบหรือส่วนที่แสดงอาการของโรคนำไปตรวจสอบยืนยันเชื้อสาเหตุใน ห้องปฏิบัติการ จัดทำตัวอย่างแห้งส่งเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานในการตรวจยืนยันการเกิดโรคเก็บสปอร์ของโรคราน้ำค้างในรูป permanent slide เพื่อจำแนกเชื้อ

4 การบันทึกข้อมูล

บันทึกข้อมูลระหว่างการสำรวจได้แก่ สถานที่ วันที่ ชื่อพืช ระยะการเจริญเติบโตของพืช ส่วนของพืชที่ถูกทำลาย ระดับความรุนแรงของโรค การแพร่กระจาย สภาพภูมิอากาศ ภูมิประเทศ

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2550 - กันยายน 2553

แหล่งปลูกข้าวโพดของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 สืบค้นข้อมูล

ได้รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของข้าวโพด และของเชื้อรา *Sclerophthora rayssiae* **และ** *Sclerophthora macrospora* จากเอกสารวิชาการและเวบไซด์

2 สำรวจและเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดในพื้นที่ปลูกข้าวโพด

ปี พ.ศ. 2551 ได้สำรวจพื้นที่และวางแผนการเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดในพื้นที่ที่มีปลูกข้าวโพดเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จ. เชียงราย จ. ตาก จ. นครราชสีมา และ จ.สระบุรี สุ่มเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างข้าวโพดครั้งที่ 1 จากแปลงข้าวโพดที่มีอายุ 3-5 สัปดาห์ ที่ อ. เมือง จังหวัดเชียงรายจำนวน 2 แปลง ที่ อ. แม่ระมาด และ อ. แม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 4 แปลง ที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา จำนวน 3 แปลง อ. มวกเหล็ก จ. สระบุรี จำนวน 1 แปลง จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างข้าวโพดครั้งที่ 2 เมื่อข้าวโพดที่อายุประมาณ 7-8 สัปดาห์ และในปี พ.ศ. 2552 ได้สำรวจพื้นที่และวางแผนการเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดซ้ำในพื้นที่เดิม จำนวน 2 ครั้ง

3. การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ

ผลการศึกษาลักษณะอาการโรคราน้ำค้างที่ปรากฏบนข้าวโพดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการโรคราน้ำค้าง ไม่พบเชื้อรา *Sclerophthora rayssiae* และ *Sclerophthora macrospore* สาเหตุโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแปลงเก็บข้อมูล

สรุปผลการทดลอง

รวบรวมข้อมูลพื้นฐานของข้าวโพด และของเชื้อรา *Sclerophthora rayssiae* และ *Sclerophthora macrospora* จากเอกสารวิชาการและเวบไซด์ ได้สำรวจพื้นที่และวางแผนการเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดในพื้นที่ที่มีปลูกข้าวโพดเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2551 จำนวน 4 จังหวัด ได้แก่ จ. เชียงราย จ. ตาก จ. นครราชสีมา และจ.สระบุรี สุ่มเก็บตัวอย่างโรคราน้ำค้างข้าวโพดจำนวน 2 ครั้งเมื่อข้าวโพดที่อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ และเมื่อข้าวโพดที่อายุประมาณ 7-8 สัปดาห์ ที่ อ. เมือง จังหวัดเชียงรายจำนวน 2 แปลง ที่ อ. แม่ระมาด และ อ. แม่สอด จังหวัดตาก จำนวน 4 แปลง ที่ อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา จำนวน 3 แปลง อ. มวกเหล็ก จ. สระบุรี จำนวน 1 แปลง และในปี พ.ศ. 2552 ได้สำรวจพื้นที่และวางแผนการเก็บข้อมูลโรคราน้ำค้างข้าวโพดซ้ำในพื้นที่เดิม นำมาศึกษาลักษณะอาการโรคราน้ำค้างที่ปรากฏบนข้าวโพด จำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ ผลการทดลองพบว่าไม่พบเชื้อรา *Sclerophthora rayssiae* และ *Sclerophthora macrospore* สาเหตุโรคราน้ำค้างข้าวโพดในแปลงเก็บข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

Delp, B. R., L. J. Stowel, and J. J. Marois. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. Phytopathology. 76: 1299-1305.

Donald, G. W. 2000. Compendium of Corn Disease. APS Press. The American Phytopathological Society. 78p.

Payak, M. M. ,1975. Trp. Agric. Res. Ser. Tokyo. 8,13-18.

Pitakspraiwan, P. and Piya, G. 1976. Morphological and cytological studies of *Sclerospora* species on corn in Thailand. Kasetsart J. 10:118-120.

Roth, G. 1967. *Sclerophthora macrospora* Sacc. on sugarcane in south Africa. Pflanzenkr.Pflanzenschutz. 74:83-100.

Shah. S. M. 1976. Downy mildew of maize in Nepal. Conference on the downy mildew diseases of maize . 4-7 October 1976. Thailand Kasetsart Journal. 10: 137-142.

Shaw CG, et al. 1976. Conference on the downy mildew diseases of maize . 4-7 October 1976. Thailand Kasetsart Journal. 10: 79-207.

Ullstrup A. J. ,1970. Crazy top of maize. Indian Phytopathol. 23: 250-261.

การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของแบคทีเรีย *Pantoea stewartii*

Surveillance and Dissemination of *Pantoea stewartii*

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล พีระวรรณ พัฒนวิภาส ณัฏฐพร อุทัยมงคล ชลธิชา รักใคร่

1/ กลุ่มวิจัยโรคพืช 2/ กลุ่มวิชากักกันพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยวของข้าวโพด (stewart's bacterial wilt disease of corn) เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางกักกันพืช จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นส้นทาง(pathway) ของเชื้อนี้ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจติดตามและเฝ้าระวังโรคเหี่ยวของข้าวโพดเชื้อนี้อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช วิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 5 แหล่ง ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2552 จำนวน 50 แปลง ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 10 แปลง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง จังหวัดเชียงราย จำนวน 10 แปลง จังหวัดลำปาง จำนวน 10 แปลง และจังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 10 แปลง ไม่พบอาการโรคเหี่ยวบนต้นกล้าของข้าวโพด ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่มีอาการใบไหม้ (leaf blight) ที่มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการโรคเหี่ยวในต้นข้าวโพด จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA พบว่าทุกตรวจอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *P. stewartii*

รหัสโครงการ 07-01-51-01-01-01-04-51

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นที่ปลูกประมาณ 7ล้านไร่ ในปี 2547 มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 871,791 ตันต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,651 ล้านบาท(ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) นอกจากนี้ประเทศไทยยังมีการสั่งนำเข้าเมล็ดข้าวโพดมีมูลค่านำเข้า เพื่อการบริโภคและเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออก โดย ในปี 2547 มีปริมาณนำเข้า 75,753 ตัน มีมูลค่าการนำเข้า 212 ล้านบาท จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นส้นทาง(pathway) ของศัตรูพืชที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ เช่นโรคเหี่ยวของข้าวโพด (stewart's bacterial wilt of corn)ได้ เนื่องจากเป็นโรคที่ถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์(seed transmission) ในข้าวโพดทุกพันธุ์ เชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีรายงานว่ามีแมลง corn flea bettle (*Chaetocnema pulicaria*) เป็นแมลงพาหะ มีรายงานการระบาดของโรคเหี่ยวของข้าวโพดในประเทศอิตาลี ในปี 1950 สาเหตุจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากประเทศอเมริกา (FAO, 1983) ประเทศไทยมีรายงานการพบโรคเหี่ยวของข้าวโพดตั้งแต่ปี 1967 (Bradbury, 1967) หลังจากนั้นมาไม่มีรายงานการพบโรคนี้อีก(CMI.1987)ต่อมาในปี 2547 สุดฤดีและคณะ ได้รายงานการพบโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา จากรายงานการตรวจพบโรคเหี่ยวของข้าวโพดนี้จึงจำเป็นต้องมีการสำรวจติดตามและเฝ้าระวังโรคเหี่ยวของข้าวโพดและเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* อย่างเป็นระบบ เพื่อเป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ ในการจัดทำวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช การกำหนดพื้นที่ปลอดศัตรูพืช และใช้ในการจัดเตรียมบัญชีรายชื่อศัตรูพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

3.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA

วิธีการ

1. ศึกษา รวบรวมข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากแหล่งผลิตที่มีการแพร่ระบาดของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* ระหว่างปี 2550 – ปี 2551

2. จัดทำแบบฟอร์มรายละเอียดของข้อมูลที่ต้องการบันทึกได้แก่ แหล่งปลูก ตำบล อำเภอ จังหวัด ช่วงเวลาในการสำรวจ พิกัดของแหล่งปลูก(GPS) ลักษณะอาการ เป็นต้น

3. การสำรวจ การสำรวจโรคเหี่ยวของข้าวโพดดำเนินการสำรวจแบบเฉพาะเจาะจง (specific survey) เพื่อให้ทราบข้อมูลโรคเหี่ยวของข้าวโพดและเชื้อสาเหตุโรค*P. stewartii* ในพื้นที่สำรวจและในเวลาที่กำหนด กำหนดพื้นที่สำรวจโดยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญของประเทศ จำนวน 5 แหล่งปลูก ใน 5 จังหวัด ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง และจังหวัดอุตรดิตถ์ วางแผนการสำรวจในพื้นที่อย่างน้อย 20 ไร่ แบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วนๆละประมาณ 5 ไร่ แต่ละส่วนทำการสุ่มสำรวจโดยวิธี completely randomized design (CRD) . จำนวน 10 จุด ขนาดพื้นที่จุดละ 2x2 เมตร สุ่มตรวจ จุดละ 20 ตัวอย่าง ตรวจแบบตัวอักษร W ซ้าย ตามวิธีของ Delp *et.al*. (1986) ทำการสุ่มตรวจทุกเดือน

.4. วิธีการตรวจวินิจฉัยโรคเหี่ยวของข้าวโพดในแปลงปลูก จัดทำรูปภาพลักษณะอาการของโรคทุกระยะของพืชจัดทำเป็นคู่มือในการสำรวจ เมื่อออกสำรวจให้สังเกตจากลักษณะอาการของโรคเปรียบเทียบกับคู่มือ และบันทึกลักษณะอาการที่พบ ถ่ายรูป เก็บตัวอย่างโรคที่พบใส่ถุงหรือภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่างพร้อมเขียนรายละเอียดกำกับ รีบนำกลับมาตรวจสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผล

5. การตรวจจำแนกในห้องปฏิบัติการ ตรวจสอบตัวอย่างด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA และ วิธี PCR ตามวิธีของ Blakemore *et.al.* (1992) ยืนยันโดยการทำการแยกเชื้อสาเหตุจากตัวอย่างโรคที่เก็บมาโดยใช้อาหารเฉพาะ Nigrosine medium

6. เก็บข้อมูลที่ได้ในรูปdata sheet เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ จัดทำรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ต.ค.50 – ก.ย.53 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกข้าวโพด ในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ของประเทศไทย

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 5 แหล่ง ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2552 จำนวน 50 แปลง ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 10 แปลง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง จังหวัดเชียงราย จำนวน 10 แปลง จังหวัดลำปาง จำนวน 10 แปลง และจังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 10 แปลง ไม่พบอาการโรคเหี่ยวบนต้นกล้าของข้าวโพด ได้ทำการเก็บตัวอย่างที่มีอาการใบไหม้ (leaf blight) ที่มีลักษณะอาการคล้ายกับอาการโรคเหี่ยวในต้นข้าวโพด จำนวน 60 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii* ด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจากบริษัท Agdia, Elkhart, Indiana, USA พบว่าทุกตรวจอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *P. stewartii*

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจแหล่งปลูกข้าวโพด 5 แหล่ง ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2551- กันยายน 2552 จำนวน 50 แปลง ได้แก่ จังหวัดแม่ฮ่องสอน จำนวน 10 แปลง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 แปลง จังหวัดเชียงราย จำนวน 10 แปลง จังหวัดลำปาง จำนวน 10 แปลง และจังหวัดอุตรดิตถ์ จำนวน 10 แปลง ไม่พบอาการของโรคเหี่ยวของข้าวโพด และยังไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. stewartii*

เอกสารอ้างอิง

สุดฤดี ประเทืองวงศ์ ประชุม จุฑาวรรธนะ กุลชนา เกศสุวรรณ์ และ สุพจน์ กาเซ็ม. 2547. การระบาดของโรคข้าวโพดจากแบคทีเรียชนิดใหม่ในประเทศไทยใ ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการโครงการข้าวโพดข้าวฟ่าง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ม 19-21 พฤษภาคม 2547. จ.อยุธยา 249-262.

Block CC, Hill JH, McGee DC, 1998. Seed transmission of Pantoea stewartii in field and sweet corn. Plant Disease, 82(7):775-780.

Bradbury JF, 1967. Erwinia stewartii. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, No. 123. Wallingford, UK: CAB International

Claflin LE, 1999. Stewart's bacterial wilt. In: Compendium of Corn Diseases. 3rd Edition. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society, 4-5.

CMI, 1987. Distribution Maps of Plant Diseases, No. 41, Edition 4. Wallingford, UK: CAB International.

Elliot C, Poos FW, 1940. Seasonal development, insect vectors, and host range of bacterial wilt of corn. Journal of Agricultural Research, 645-686

EPPO, 2005. PQR database (version 4.4). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization

FAO, 1983. Reappearance of *Erwinia stewartii* in the Po valley. FAO Plant Protection Bulletin 31,96.

Guo YF, Liang ZQ, Lu GQ, Xie BC, 1987. Survival conditions of *Erwinia stewartii* in stored corn. Acta Phytophylactica Sinica, 14(1):39-44.

OEPP/EPPO, 1987. Data sheet on quarantine organisms No. 54, *Erwinia stewartii*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 8:2.

Pepper EH, 1967. Stewart's Bacterial Wilt of Corn. Monogr. 4. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.

Robert AL, 1955. Bacterial wilt and Stewart's leaf blight of corn. USDA Farmer's Bulletin, 2092.

ภาคผนวก

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวบนเหี่ยวบนต้นกล้าข้าวโพด

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคต้นข้าวโพด

การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ศรีสุข พูนผลกุล ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
วงศ์ บุญสืบสกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจการเกิดโรคผลเน่า (Fruit blotch) จากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* ในแปลงผลิตเมลอน (แคนตาลูป) ระหว่างเดือนมกราคม 2550 ถึงเดือนมิถุนายน 2551 อ. อรัญประเทศ จ. สระแก้ว โดยติดตามการเกิดโรคใน 4 ระยะการเจริญ คือ ระยะกล้า ระยะเจริญและติดดอก ระยะผลอ่อน และระยะผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยวผลผลิต พบการเกิดโรคระยะกล้าในระดับต่ำ ลักษณะอาการใบเลี้ยงเป็นแผลไหม้ช้ำ ในระยะผลอ่อนมีอาการผลจุดช้ำขนาดเล็ก 0.1-0.3 มม. พบผลที่แสดงอาการแผลจุด 20-80 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่แผลจุดกระจายเฉลี่ย 1-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผล ซึ่งอาจพัฒนาแผลจุดช้ำขนาดใหญ่และเข้าทำลายลึกถึงเนื้อในผลเกิดโรคผลเน่าในระยะผลแก่เก็บเกี่ยวผลผลิต 10-15 % ผลผลิตส่วนใหญ่มีอาการแผลจุดแต่ไม่เกิดอาการผลเน่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาการที่ใบพบแผลจุดขอบแผลช้ำ ที่ก้านใบและลำต้นพบอาการเน่าช้ำ แต่เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรค

ในปี 2552 สำรวจโรคในในพื้นที่ปลูกแคนตาลูปและเมลอน ภาคกลาง ผลการสำรวจโรคในพื้นที่จังหวัดอยุธยา พบว่าระยะกล้า มีอาการใบเลี้ยงเน่าช้ำ ในกะบะเพาะเมล็ด ระยะติดดอกและระยะติดผลอ่อน พบอาการใบเหลืองแห้ง ทั้งสองอาการพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่า 1 % โดยตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรค ระยะผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยวผลผลิต พบอาการใบจุดขอบแผลช้ำ และผลจุดช้ำ ประมาณ 10-20% แต่ตรวจไม่พบสาเหตุโรคจากการแยกเชื้อบนอาหาร ทั้งนี้ทุกแปลงพบอาการโรคอื่น ๆ คือ ราน้ำค้าง ราแป้ง ใบด่าง พื้นที่จังหวัดสิงห์บุรี แปลงเมลอนพันธุ์ฮันนี่บอล พบอาการผลเน่า และอาการใบแห้ง ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย แปลงเมลอน อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี ระยะกล้า ระยะเจริญและติดดอก และระยะเก็บเกี่ยว ไม่พบอาการโรค พบปัญหาแมลง และต้นเหี่ยว ส่วนในแหล่งปลูก อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ระยะกล้า พบอาการใบไหม้ 0.3% ระยะเก็บเกี่ยว พบปัญหามากในฤดูฝน ที่มีฝนตกชุก เกิดอาการผลเน่า เสียหาย ประมาณ 10% พบโรคจากสาเหตุอื่น ได้แก่ ราน้ำค้าง ราแป้ง โรคต้นแตงยางไหล ใบด่าง และความเสียหายจากแมลง

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-01-01-05-51

คำนำ

โรคผลเน่า (Fruit blotch) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad et al.,1978) ต่อมามีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Acidovorax avanae* subsp.*citrulli* โรคผลเน่าเป็นโรคที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลแตง โดยเฉพาะ แตงโม แคนตาลูป เมลอน และสควอช พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมาพบระบาดในหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ จีน อิสราเอล ญี่ปุ่น ตุรกี บราซิล และออสเตรเลีย (CAB International, 2005) Latin and Rane (1990) รายงานพบการระบาดในรัฐอินเดียน่า ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้ผลผลิตแตงโมที่เจริญเติบโตเต็มที่เน่าเสียหายมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก ต่อมาพบระบาดในอีกหลายรัฐของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ ฟลอริดา (Somodi et al.,1991), โอคลาโฮมา (Jacob et al., 1992) เซาท์คาโรไรน่า , นอร์ธคาโรไรน่า, เมรี่แลนด์ (Hopkins et al., 1992)

ในประเทศไทย มีรายงานการพบโรคผลเน่าแตงโม ในเขต จ.สกลนคร และ จ.นครราชสีมา ในปี 2536 (ณัฏฐิมา, 2537) ต่อมาในปี พ.ศ. 2538-2540 ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสารเรืองแสง (non-fluorescent) สร้างเอนไซม์ oxidase รูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod-shape) ลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ สีขาวครีม เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปปลูกเชื้อลงบนใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมทำให้ต้นกล้าแสดงอาการ โดยทำให้ใบเลี้ยงหลุดร่วงภายใน 7 วัน และเมื่อปลูกเชื้อลงบนผลแตงโมสามารถทำให้ผลแตงโมเน่าเสียภายใน 14 วัน (ณัฏฐิมา, 2540) ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* จัดเป็นเชื้อต้องห้ามที่สำคัญทางการกักกันพืช (Wall et al.,1990)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจโรคในแหล่งปลูก

สำรวจ รวบรวมโรคจาก แหล่งปลูกพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงโม แตงแคนตาลูป เมลอน เป็นต้น โดยทำการสุ่มสำรวจเพื่อประเมินและติดตามการเกิดโรคผลเน่าแตง ในแหล่งปลูกที่สำคัญในการผลิต และในแหล่งปลูกที่เคยมีรายงานการเกิดโรคระบาด จากการสอบถามข้อมูลพบว่าเกษตรกรในเขตอำเภออรัญประเทศ จังหวัดสระแก้ว มีการปลูกเมลอน (แคนตาลูป) ซึ่งเป็นพืชตระกูลแตงที่ได้รับความเสียหายจากโรคผลเน่ามานาน และมีความรุนแรงขึ้นทุกปี จึงเลือกสุ่มสำรวจโรค โดยการติดตามการเกิดโรคในระยะการเจริญต่าง ๆ โดยเมลอน เป็นพืชที่มีอายุการเก็บเกี่ยว 60-70 วัน จึงแบ่งช่วงการสำรวจ ดังนี้

-ระยะกล้า อายุ10-20 วัน มีใบเลี้ยง 2 คู่ หรือต้นกล้าหลังการย้ายกล้ามีใบจริง 1-2 ใบ

-ระยะการเจริญและออกดอก อายุ 21-35 วัน เป็นระยะที่ต้นเจริญ ออกดอกและติดผลอ่อน

-ระยะติดผล อายุ 36-50 วัน เป็นระยะติดผลขนาดเล็ก ถึงขนาดใหญ่

-ระยะผลแก่และเก็บเกี่ยว อายุ 51-70 วัน เป็นระยะที่ผลใหญ่และมีการเก็บเกี่ยว

<u>การเก็บและบันทึกข้อมูล</u>

- บันทึกแหล่งที่สำรวจ ชื่อพืช พื้นที่ปลูก พันธุ์ ระยะการเจริญของพืช สภาพแวดล้อมอื่นๆ
- บันทึกลักษณะอาการการเกิดโรค ส่วนของพืชที่พบอาการ ประเมินความรุนแรงของโรค คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค
- บันทึกการเกิดโรคบนพืชอาศัยอื่นๆ ลักษณะอาการหรือบนวัชพืชบริเวณแปลงปลูก

สุ่มตรวจดูอาการผิดปกติทั้งต้น ประเมินความรุนแรง จำนวน 25 ต้นต่อแปลง จากนั้นประเมินการเกิดโรคในภาพรวมทั้งแปลง

2. **วินิจฉัยตัวอย่างโรคพืช และตรวจพิสูจน์เชื้อ** *A. avenae* subsp. *citrulli*

เก็บตัวอย่างอาการโรคจากแปลงปลูก นำมาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการบนอาหารสังเคราะห์ Nutrient glucose agar และ Tween agar เลือกโคโลนีเดี่ยว เลี้ยงให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จำแนกชนิดของเชื้อ ตรวจเชื้อด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และเทคนิคพีซีอาร์ ทดสอบคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค โดยการฉีดเซลล์แขวนลอยเชื้อเข้าใต้ใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโม และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ ของเชื้อ

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงปลูกเมลอนของเกษตรกร อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจโรคในแหล่งปลูก

สำรวจโรคในแหล่งปลูกเมลอน อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว ซึ่งมีการปลูกเมลอนเป็นการค้ามานานนับ 40 ปี พื้นที่ปลูกรวม 600 -1,200 ไร่ ต่อปี ปลูกมากที่ตำบลผ่านศึก และตำบลป่าไร่ มีการปลูกหมุนเวียนตลอดปี (5-6 รุ่นต่อปี) เกษตรกรมีการย้ายที่ปลูกเนื่องจากปัญหาศัตรูพืช พันธุ์เมลอนที่ปลูกได้แก่ พันธุ์ซันเลดี้ พันธุ์สีทอง พันธุ์ฮันนี่เวิล์ด เรดดิว พอร์ทออเรนท์ และฮันนี่ดิว เกษตรกรซื้อเมล็ดพันธุ์ลูกผสมจากบริษัทเพื่อนเกษตร และบริษัทตะวันรุ่ง

จากการสอบถามเกษตรกร พบว่าปัญหาโรคที่พบในการผลิต ได้แก่ ราแป้ง ราน้ำค้าง แต่ไม่เป็นปัญหามากนัก เนื่องจากมีการพ่นสารเคมีควบคุม และโรคใบด่างเหลืองจากไวรัส ยอดหงิก เนื่องจากแมลงเป็นพาหะนำโรคพบมากแต่ยังเก็บผลผลิตได้ และปัญหาที่สำคัญคือโรคผลเน่า ทำให้ผลเมลอนเน่าเสีย ผลผลิตไม่มีคุณภาพ โดยเฉพาะในช่วงฤดูฝนที่มีอากาศร้อนชื้นโรคผลเน่าเป็นปัญหามากที่สุด

ในการปลูกเมลอนเกษตรกรเพาะเมล็ดในถาดหลุมวางเรียงบนแพท่อนไม้ไผ่บนดิน จากนั้นย้ายกล้าปลูก ขึ้นค้างไม้ไผ่เมื่อต้นเริ่มสูงขึ้นและเลื้อย (ภาพที่ 1) เก็บผลผลิตเมื่อเมลอนอายุประมาณ 60 วัน เก็บผลผลิตรวมกันแล้วคัดขนาดและคุณภาพ ผลจากการสำรวจติดตามอาการโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย เก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อและพิสูจน์โรค ดังนี้

-<u>ระยะกล้า</u> พบอาการใบเลี้ยงเน่าช้ำ และไหม้ ในต้นกล้าหลังการย้ายปลูกลงแปลง อายุประมาณ 15 วัน (ภาพที่ 2ก) พบการเกิดโรคต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่อมาพบว่าใบเลี้ยงไหม้และหลุดร่วงไป ทำให้ต้นเมลอนสามารถเจริญได้ปกติ ซึ่ง Hopkins และคณะ (1992) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของแตงโมสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้า หากอาการรุนแรงสามารถทำให้ต้นกล้าตายได้

-<u>ระยะการเจริญและออกดอก</u> ที่ใบพบอาการแผลจุดขอบแผลช้ำสีเขียวอมเหลืองอ่อน (ภาพที่ 2ข) ซึ่งพบได้เกือบทั้งต้นโดยพบมากบริเวณใบที่ 2-5 จากยอด พบมาก 20-50 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ไม่มีรายงานอาการโรคทางใบ Hopkins et al. (1992) รายงานว่าในระยะต้นโตเชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายพืชได้แต่อาการไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการเลยแต่แฝงอยู่บนต้น เมื่อผลเจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยวเชื้อจะเข้าทำลายผล ทำให้ผลแตงโมแสดงอาการของโรคและเน่าเสียไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้

-ระยะติดผล พบอาการผลจุดขนาดเล็ก 1 มม. แผลขยายขนาดขึ้นเมื่อผลใหญ่ขึ้น (2-3 มม.)บางแผลมีอาการจุดนูนช้ำเป็นสีเขียว (ภาพที่ 2ค) พบอาการโรค 20-80 เปอร์เซ็นต์ และอาการก้านใบและลำต้นเน่าช้ำ (ภาพที่ 2ง)

-ระยะผลแก่และเก็บเกี่ยว พบอาการผลจุด 80-90 เปอร์เซ็นต์ โดยพบอาการผลเน่า 5-10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2จ-ฉ) เช่นเดียวกับอาการโรคผลเน่าของแตงโม ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยว พบอาการเป็นจุดแผลช้ำฉ่ำน้ำ แผลพัฒนาอย่างรวดเร็วเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำคล้ายรอยเปื้อนน้ำมันขยายลามไม่มีขอบเขต ในเวลา 2-3 วันจะขยายลามคลุมทั่วทั้งผลทำให้ผลแตงโมแตกเนื้อแตงโมภายในเน่าเสีย ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ (Schaad et al.,1978; Hopkins et al.,1992 ; Latin and Rane,1990)

สำหรับผลเน่าที่เกษตรกรเก็บผลผลิตออกจากแปลง จะถูกคัดออกและโยนทิ้งไว้ข้างแปลง ซึ่งจะเป็นแหล่งเชื้อในการปลูกพืชรุ่นต่อไป ทำให้เกษตรกรไม่สามารถปลูกซ้ำที่ได้ จึงต้องย้ายที่ปลูกบ่อย ๆ

การสำรวจโรคในปี 2552 ได้ผลเช่นเดียวกับในปีที่ผ่านมา เนื่องจากการปลูกเมลอน เกษตรกรจะย้ายที่ปลูกโดยเช่าที่ใหม่ ทุกรุ่นไม่ปลูกซ้ำที่เดิม หากเกษตรกรจะปลูกซ้ำที่เดิมจะเว้นการปลูกไว้อย่างน้อย 2-3 ปี เนื่องจากต้องการหลีกเลี่ยงปัญหาโรคและแมลง

จากการสำรวจพบว่า เกษตรกรปลูกแตงแคนตาลูป และเมลอน หลายพันธุ์ ได้แก่ แตงแคนตาลูป เนื้อเขียว เปลือกแข็งเป็นตาข่าย และปลูกเมลอน หลายพันธุ์ เนื้อเขียวได้แก่ ฮันนี่เวิลด์ เนื้อส้ม ได้แก่ ฮันนี่ดิว ซันสวีท เป็นต้น อายุพืชตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวผลผลิต ประมาณ 65-75 วัน เกษตรกรรู้จักโรคผลเน่า และเรียกว่า ราเข้าลูก พบทำความเสียหายกับเมลอนมากในระยะเก็บเกี่ยว ปัญหาผลเน่าจะพบมากในฤดูฝน ที่มีสภาพอากาศร้อนอบอ้าว ฝนชุกติดต่อกันหลายวัน

แปลงแคนตาลูป เมลอน และแตงโม แหล่งปลูก อ.บางไทร จ.อยุธยา พบว่าเจ้าของแปลงมีการรักษาสุขอนามัยของแปลงเป็นอย่างดี เริ่มตั้งแต่การเพาะกล้า เลือกย้ายกล้าที่สมบูรณ์แข็งแรง และเมื่อต้นเจริญขึ้นประมาณ 20-25 วัน จะทำการมัดโยงต้นขึ้นค้างแล้ว หมั่นสำรวจแปลง เด็ดใบเลี้ยงคู่แรก และใบด้านล่างออกทิ้ง ช่วยทำให้ลำต้นโปร่ง พบว่าสามารถลดปัญหาการเกิดโรคผลเน่าได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถปลูกซ้ำที่เดิมได้

2. วินิจฉัยตัวอย่างโรคพืช และตรวจพิสูจน์เชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli*

การแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าจากอาการที่เก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกเมลอน บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) อายุ 48 ชั่วโมง พบแบคทีเรียลักษณะโคโลนีกลมนูนสีขาว

ขุ่น ขนาดเล็ก 1-2 มม. บนอาหาร Yeast Extract Dextrose $CaCO_3$ (YDC) โคโลนีกลมสีครีมอมส้ม ขอบราบ เมื่อโคโลนีอายุ 4-5 วันจะสร้างคราบเป็นรอยบางรอบโคโลนี และบนอาหาร Tween agar (TW) อายุ 48 ชั่วโมง แบคทีเรียมีโคโลนีกลมนูนสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก รอบโคโลนีสร้างฝ้าเป็นตะกอนขาวขุ่น (ภาพที่ 3) แยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารจากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้จากการสำรวจ ได้ผลดังนี้

-อาการแผลเน่าช้ำบริเวณใบเลี้ยง แยกได้เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

-อาการแผลจุดช้ำที่ใบ จากการเก็บตัวอย่าง 5 ครั้ง 25 ตัวอย่าง แยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ ไม่พบลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยส่วนมากพบโคโลนีกลมนูนสีเหลือง ซึ่งเมื่อทำการปลูกเชื้อกลับที่ใบเมลอน ไม่เกิดอาการโรค

-อาการก้านใบเน่าช้ำ แยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรค

-อาการผลจุด แผลจุดช้ำที่แยกได้เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค ลักษณะอาการแผลจุดที่เป็นร่องแผลลึก เมื่อผ่าผลพบอาการที่เชื้อเข้าทำลายทะลุไปถึงเนื้อทำให้เนื้อเมลอนเป็นสีน้ำตาล และทำให้เนื้อเยื่อที่ยึดเกาะเมล็ดล่มกลายเป็นน้ำ และอาการแผลจุดช้ำที่เชื้อลุกลาม ไหลเป็นร่องช้ำเป็นแนว ต่อมาเชื้อลุกลามลงไปที่เนื้อทำให้เกิดอาการเน่าช้ำ (ภาพที่ 4) โดยอาการทั้งสองลักษณะแยกเชื้อได้เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli*

จากข้อสังเกตพบว่าอาการโรคผลเน่าของเมลอน มีลักษณะคล้ายกับอาการโรคผลเน่าของแตงโม โดยพบได้ในระยะกล้าและพบอาการที่ผล Hopkins et al. (1992) รายงานว่าผลแตงโมที่เจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยว พบอาการเป็นจุดแผลช้ำฉ่ำน้ำ แผลพัฒนาอย่างรวดเร็วเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำคล้ายรอยเปื้อนน้ำมันขยายลามไม่มีขอบเขต แต่เมลอนมีลักษณะของผิวเปลือกและเนื้อที่แข็งกว่าแตงโม ทำให้การพัฒนาอาการเกิดได้ช้ากว่าเล็กน้อย

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจโรคเพื่อการเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง พบการเกิดโรคระยะกล้าในระดับต่ำ ลักษณะอาการใบเลี้ยงเป็นแผลไหม้ช้ำ ในระยะผลอ่อนมีอาการผลจุดช้ำขนาดเล็ก 0.1-0.3 มม. พบผลที่แสดงอาการแผลจุด 20-80 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่แผลจุดกระจายเฉลี่ย 1-50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผล ซึ่งอาจพัฒนาแผลจุดช้ำขนาดใหญ่และเข้าทำลายลึกถึงเนื้อในผลเกิดโรคผลเน่าในระยะผลแก่เก็บเกี่ยวผลผลิต 10-15 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นผลที่มีอาการแผลจุดแต่ไม่เกิดอาการผลเน่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอาการที่ใบพบแผลจุดขอบแผลช้ำ ที่ก้านใบและลำต้นพบอาการเน่าช้ำ แต่เมื่อนำมาแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรค

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา บุญวัฒน์. 2537. โรคผลเน่า : ปัญหาใหม่ของแตงโม. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา.4:20

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2540. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2540 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Hopkins, D.L, T. Kucharek, D. Gay, R. Gitaitis, W. Cook and A. Keirath. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon. Report of Asgrow Seed Company. USA. 3 p.

Jacobs, J.L., J.P. Damicone and B.D. Mcgraw. 1992. First Report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. Plant Dis. 76: 1185.

Latin, R.X. and K.K. Rane. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. Plant Dis. 74: 331.

Schaad, N.W., G.Jr. Sowell, R.W. Goth, R.R. Colwell and R.E. Webb. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol.28:117-125.

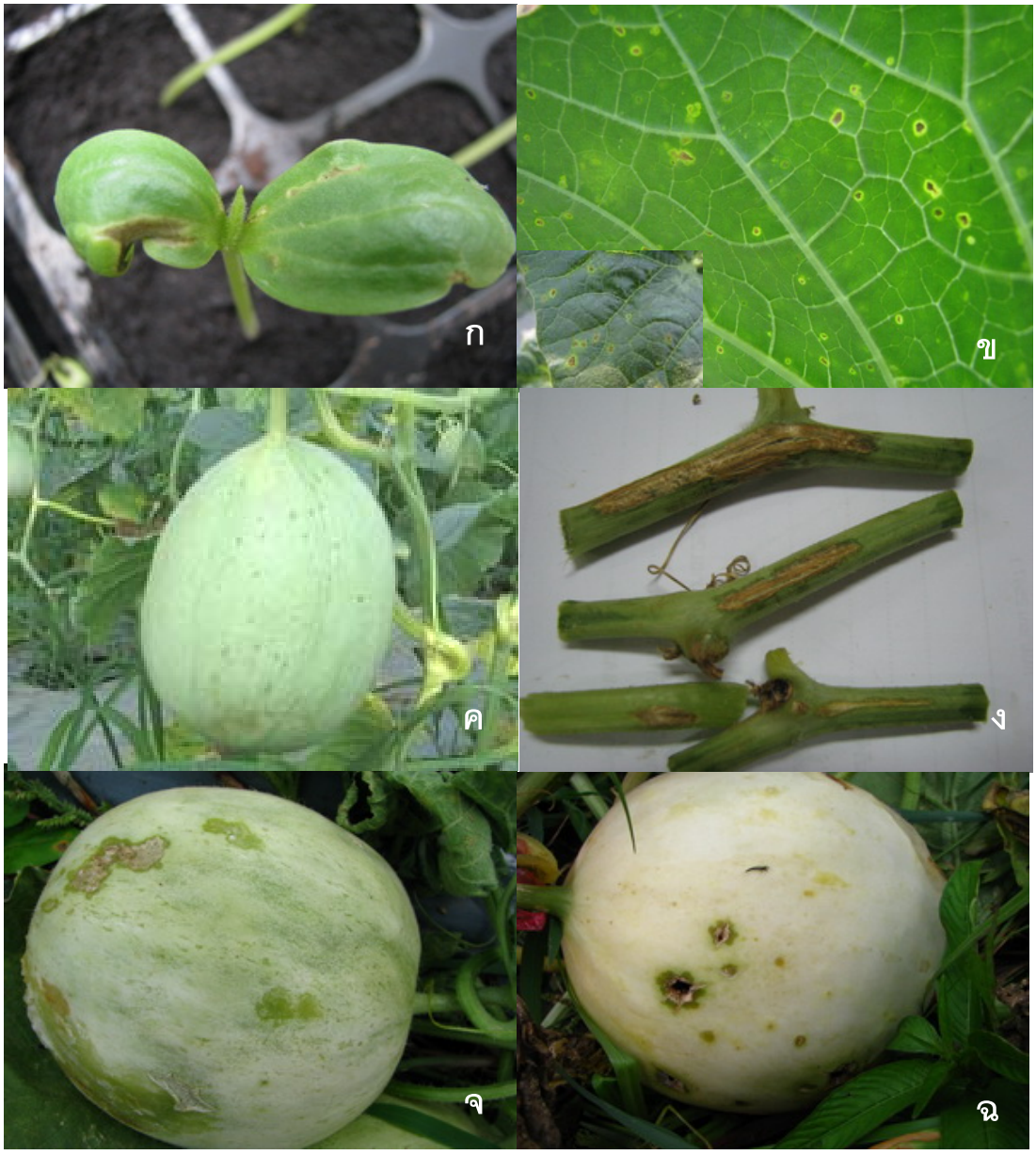
Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

Sowell, G.Jr. and N.W. Schaad. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subp. *citrulli.* on watermelon : Seed transmission and resistance of plant introductions. Plt. Dis. Rept. 63 : 437-441.

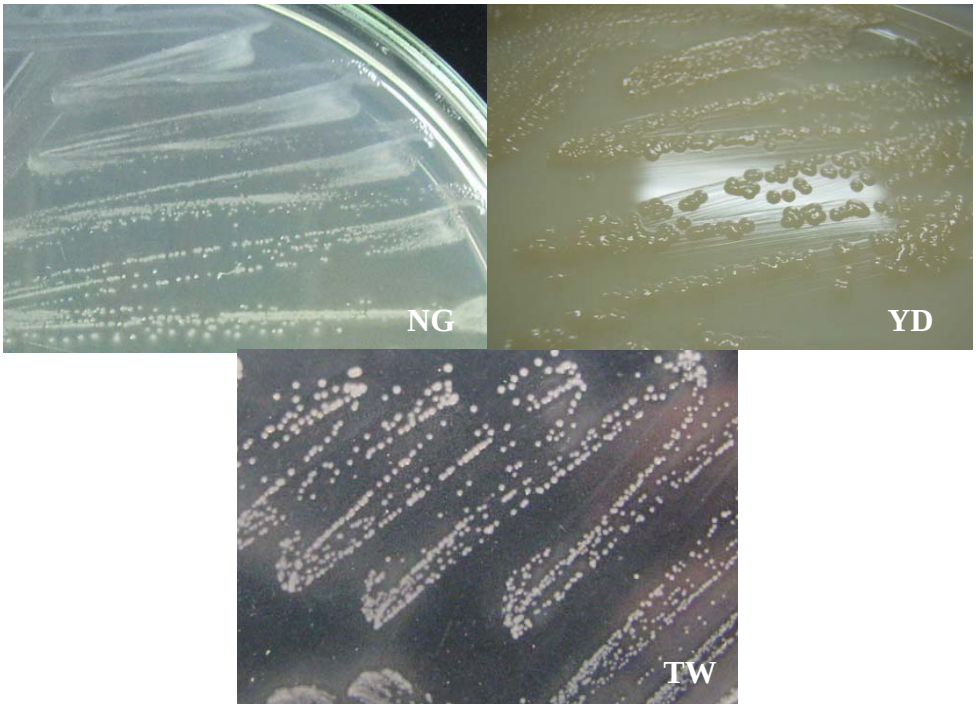
Wall, G.C., V.M. Santos, F.J. Cruz and D.A. Nelson. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana Islands. Plant Dis. 74:80.

Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters and J. De Ley. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Psuedomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovarax avenae* subsp. *avenae* subsp.nov. comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidorovax konjaci*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 107-119.

ภาพที่ 1 การปลูกเมลอนของเกษตรกร อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการที่คาดว่าเป็นโรคผลเน่า ที่เก็บรวบรวมตัวอย่างมาพิสูจน์เชื้อ



ภาพที่ 3 ลักษณะ typical โคโลนีเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

ภาพที่ 4 อาการผลเน่าของเมลอนเปรียบเทียบลักษณะแผลภายนอกผลและภายในผล

ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแบคทีเรีย *Acidovorax avanae avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของพืชตระกูลแตง : การมีชีวิตรอด การอาศัยอยู่ และการศึกษาจำนวนประชากรแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง ในดิน และน้ำจากแหล่งปลูก

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ทำการทดสอบการมีชีวิตรอด การอาศัยอยู่ และการศึกษาจำนวนประชากรแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์แตงโมและเมล่อน โดยการปลูกเชื้อ Aac ลงในผลแตงโมและเมล่อน จนได้เมล็ดที่ติดเชื้อ Aac 98 และ 84 % ของเมล็ดทั้งหมด ตามลำดับ จากนั้นเก็บเมล็ดติดเชื้อในสภาพเย็น ส่วนหนึ่งนำมาตรวจการมีชีวิตรอดบนอาหาร Tween agar ทุก ๆ เดือน และอีกส่วนหนึ่งนำไปปลูกทดสอบการถ่ายทอดโรคทุก ๆ 2 เดือน ผลการทดสอบ พบว่า หลังการเก็บเมล็ดแตงโมและเมล่อนที่ติดเชื้อ Aac เป็นเวลา 10 เดือน พบปริมาณเมล็ดที่ตรวจพบแบคทีเรีย Aac ที่มีชีวิตรอดเท่ากับ 60% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด และผลการทดสอบการถ่ายทอดโรคของเมล็ดติดเชื้อ พบว่า หลังการเก็บเมล็ดติดเชื้อเป็นเวลา 10 เดือน แตงโมสามารถแสดงอาการของโรคในระยะกล้าและระยะออกดอกได้ถึง 62.79 และ 78.48% และในเมล่อนสามารถแสดงอาการของโรคได้ถึง 76.92 และ 86.44% ของจำนวนต้นทั้งหมด ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 07 01 51 01 01 01 06 51

คำนำ

โรคผลเน่า (Fruit blotch) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad *et al*.,1978) ต่อมามีการเปลี่ยนชื่อเป็น *A. avanae* subsp.*citrulli* (Aac) โรคผลเน่าเป็นโรคที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลแตง โดยเฉพาะ แตงโม แคนตาลูป เมลอน และสควอช พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1965 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ต่อมาพบระบาดในหลายประเทศทั่วโลก ได้แก่ จีน อิสราเอล ญี่ปุ่น ตุรกี บราซิล และออสเตรเลีย (CAB International, 2005)

Latin และ Rane (1990) รายงานพบการระบาดในรัฐอินเดียน่า ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้ผลผลิตแตงโมที่เจริญเติบโตเต็มที่เน่าเสียหายมากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก ต่อมาพบระบาดในอีกหลายรัฐของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้แก่ ฟลอริดา (Somodi *et al*.,1991), โอคลาโฮมา (Jacob *et al*., 1992) เซาท์คาโรไรน่า , นอร์ธคาโรไรน่า, เมรี่แลนด์ (Hopkins *et al*., 1992) นอกจากนี้มหาวิทยาลัยไอโอวาสเตรท ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตรอดและการถ่ายทอดโรคของเชื้อ Aac พบว่า เมล็ดแตงโมและเมล่อนที่ติดเชื้อแบคทีเรียนี้ที่เก็บไว้เป็นเวลา40 และ 34 ปีตามลำดับ ยังคงมีชีวิตรอดและสามารถถ่ายทอดโรคได้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย Aac มีความทนทานสูง (Block and Shepherd, 2008)

ในประเทศไทย มีรายงานการพบโรคผลเน่าแตงโม ในเขต จ.สกลนคร และ จ.นครราชสีมา ในปี 2536 (ณัฏฐิมา, 2537) ต่อมาในปี พ.ศ. 2538-2540 ได้ศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่า พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสารเรืองแสง (non-fluorescent) สร้างเอนไซม์ oxidase รูปร่างเป็นท่อนสั้น (rod-shape) ลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ สีขาวครีม เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ไปปลูกเชื้อลงบนใบเลี้ยงของต้นกล้าแตงโมทำให้ต้นกล้าแสดงอาการ โดยทำให้ใบเลี้ยงหลุดร่วงภายใน 7 วัน และเมื่อปลูกเชื้อลงบนผลแตงโมสามารถทำให้ผลแตงโมเน่าเสียภายใน 14 วัน (ณัฏฐิมา, 2540)

ณัฏฐิมา และคณะ (2540) ได้ผลิตแอนติซีรัมโดยวิธี Glutaraldehyde Fixed Cells เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม พบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถเกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv.*citri* ,*X. campestris* pv.*campestris, Erwinia carotovora* pv.*cartovora* และ *Pseudomonas solanacearum* แสดงว่าแอนติซีรัมที่ได้ค่อนข้างเฉพาะเจาะจงกับเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*

โรคผลเน่าพบเป็นปัญหาระบาดครั้งแรกในแตงโม ผลที่เจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยว พบอาการเริ่มแรกเป็นจุดแผลช้ำฉ่ำน้ำ แผลพัฒนาอย่างรวดเร็วเปลี่ยนเป็นสีเขียวคล้ำคล้ายรอยเปื้อนน้ำมันขยายลามไม่มีขอบเขต ในเวลา 2-3 วันจะขยายลามคลุมทั่วทั้งผลทำให้ผลแตงโมแตกเนื้อ

แตงโมภายในเน่าเสีย ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ (Schaad *et al*.,1978; Hopkins et al.,1992 ; Latin and Rane,1990)

Latin และ Rane (1990) พบว่าการระบาดของโรครุนแรงบนผลแตงโมก่อนเก็บเกี่ยว 2 อาทิตย์ Hopkins และคณะ (1992) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคผลเน่าของแตงโมสามารถเข้าทำลายได้ตั้งแต่ระยะต้นกล้าโดยสามารถทำให้ต้นกล้าตายได้ แต่ในระยะต้นโตในสภาพแปลงปลูกเชื้อแบคทีเรียนี้เข้าทำลายได้แต่อาการไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการเลยแต่แฝงอยู่บนต้นแตงโม เมื่อผลแตงโมเจริญเติบโตเต็มที่ใกล้เก็บเกี่ยวเชื้อจะเข้าทำลายผลแตงโม ทำให้ผลแตงโมแสดงอาการของโรคและเน่าเสียไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ Frankle และคณะ (1993) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคผลเน่าของแตงโมสามารถเข้าทำลายผลแตงโมโดยเข้าทางปากใบของผลแตงโม เชื้อแบคทีเรียสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ และแพร่กระจายไปยังแหล่งต่างๆ ทั่วโลกได้ (Sowell and schaad,1979 ; Rane and Latin,1992) ในปัจจุบันเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* จัดเป็นเชื้อต้องห้ามที่สำคัญทางด้านการกักกันพืช (Wall *et al*., 1990)

การป้องกันกำจัดโรคนี้ได้มีรายงานโดย Hopkins และคณะ (1992) ว่า วิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้ควรใช้เมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรคและสามารถใช้สารเคมีพวกสารประกอบทองแดงลดการเกิดโรคได้ โดยฉีดพ่นขณะที่เริ่มติดผลควรใช้ 2-3 ครั้ง แต่ต้องระมัดระวังเนื่องจากสารประกอบทองแดงอาจมีผลทำให้ต้นแตงโมชะงักการเจริญเติบโตได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ PSA

(Potato sucrose agar) และ Tween agar

2. เชื้อแบคทีเรีย *A. avanae* subsp. *citrulli*

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ

4. ผลแตงโมและเมล่อน

4. ดินปลูก

5. กระถางปลูก

วิธีการ

1. ศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง

1.1 การเตรียมเมล็ดติดเชื้อ

<u>การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย Aac</u>

1. เลี้ยงแบคทีเรีย Aac บนอาหาร PSA ประมาณ 25 plates เป็นเวลา 48 ชม.

2. นำมาทำเป็น cell suspension ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^8 cfu/ml.

<u>การเตรียมผลแตงโมและเมล่อน</u>

นำผลแตงโมพันธุ์กินรี และเมล่อน มาล้างให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 75% จากนั้นผึ่งให้แห้ง

<u>การปลูกเชื้อและการเก็บเมล็ดติดเชื้อ</u>

1. ใช้เข็มฉีดยาขนาด 5 มล. ดูด cell suspension ของแบคทีเรีย Aac ปริมาตร 5 มล. ฉีดเข้าที่ผิวเปลือกแตงโมและเมล่อน 2 จุด

2. บ่มเชื้อไว้จนปรากฏอาการของโรค 100% คือผลแตงโมและเมล่อนแสดงอาการผลเน่าทั้งผล ซึ่งใช้เวลาประมาณ 7 วัน

3. ใช้มีดที่สะอาดผ่าผลแตงโมและเมล่อน เลือกเก็บเฉพาะเมล็ด นำไปผึ่งในที่ร่ม จนแห้งสนิท เก็บใส่ถุงพลาสติก แช่ในตู้เย็นไว้ทดสอบต่อไป

1.2 การตรวจการมีชีวิตรอดบนเมล็ดติดเชื้อ

นำเมล็ดติดเชื้อมาตรวจสอบการมีชีวิตรอดทุก ๆ 1 เดือน โดยวิธี dilution plate technique ปฏิบัติดังนี้

1. นำเมล็ดติดเชื้อที่เก็บไว้ มาแช่ในน้ำสะอาดนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มล. โดยใช้ 1 เมล็ดต่อ 1 หลอด นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที นำน้ำที่ได้ไปทำให้เจือจาง นำความเข้มข้น 10^6- 10^8 cfu/ml. มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง tween agar

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

3. นับปริมาณเซลล์ Aac ที่ได้ นำมาคำนวณคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของเมล็ดที่พบเชื้อ Aac ที่มีชีวิดรอด

2. การทดสอบการถ่ายทอดโรคของเมล็ดติดเชื้อ Aac หลังจากเก็บไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง

นำเมล็ดแตงโมและเมล่อนติดเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 18 องศาเซลเซียส มาปลูกในกระถางปลูก 5 ต้นต่อกระถาง จำนวน 25 กระถาง รวม 125 ต้น ต่อชนิดพืช โดยปลูกทุก ๆ

2 เดือน ในสภาพโรงเรือน ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นที่ปรากฏอาการของโรคตั้งแต่เริ่มงอกจนกระทั่งออกดอกหรือเริ่มติดผล โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบโดยการปลูกเมล็ดพันธุ์ปลอดเชื้อ (เมล็ดพันธุ์ที่ฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 5%) นำมาคำนวณโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ของการเกิดโรค เปรียบเทียบกับจำนวนต้นทั้งหมด

เวลาและสถานที่ **เริ่มต้น** ตุลาคม 2551 **สิ้นสุด** กันยายน 2552
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* บนเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง

ผลการทดลองพบว่า หลังการเก็บเมล็ดแตงโมติดเชื้อแบคทีเรีย Aac ในตู้เย็นเป็นเวลา 8 เดือน พบว่าปริมาณเมล็ดแตงโมที่ตรวจพบแบคทีเรีย Aac ที่ยังมีชีวิต ยังมีปริมาณสูงโดยไม่ต่ำกว่า 90% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณเริ่มต้น (ปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 98% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด) แต่เมื่อเก็บเมล็ดไว้เป็นเวลา 10 เดือน พบว่าปริมาณเมล็ดแตงโมที่ตรวจพบ Aac ที่มีชีวิต ลดลงประมาณ 20% โดยมีปริมาณเมล็ดที่ตรวจพบแบคทีเรีย Aac เหลือเท่ากับ 60% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด (ตารางที่ 1)

ในการทดสอบบนเมล็ดเมล่อน พบว่า หลังการเก็บเมล็ดเมล่อนในตู้เย็นเป็นเวลา 9 เดือน พบว่า ปริมาณเมล็ดเมล่อนที่ตรวจพบแบคทีเรีย Aac ที่มีชีวิตมีปริมาณไม่ต่ำกว่า 80% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด โดยมีปริมาณลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น (84%) แต่เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 10 เดือน พบว่าปริมาณเมล็ดเมล่อนที่ตรวจพบ Aac ที่มีชีวิต ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีปริมาณที่ตรวจพบเท่ากับ 60% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมด (ตารางที่ 2)

2. การทดสอบการถ่ายทอดโรคของเมล็ดติดเชื้อ Aac หลังจากเก็บไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง

ผลการทดสอบการนำเมล็ดแตงโมที่มีการติดเชื้อ Aac ซึ่งเก็บไว้เป็นระยะเวลาหนึ่งมาปลูกเพื่อทดสอบการถ่ายทอดโรค พบว่า ต้นแตงโมที่เจริญเติบโต สามารถแสดงอาการของโรคทุกระยะการเจริญเติบโต แต่อาการของโรคจะปรากฏรุนแรงในระยะกล้าและระยะออกดอกจนถึงเริ่มติดผลอ่อน โดยในระยะกล้าอาการจะปรากฏชัดเจนบนใบ ทั้งใบเลี้ยงและใบจริง ลักษณะอาการเริ่มแรกจะเป็นจุดแผลช้ำสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะฉ่ำน้ำ เมื่อจุดแผลขยายใหญ่ ซึ่งบนใบจริงอาการมักจะขยายและถูกจำกัดด้วยเส้นเวน แผลที่ลุกลามจะเห็นเป็นแผลสีน้ำตาลเข้มชัดเจน โดยพบว่าหลังการเก็บเมล็ดติดเชื้อเป็นเวลา 10 เดือน แตงโมสามารถแสดงอาการของโรคในระยะกล้าและระยะออกดอกได้ถึง 62.79 และ 78.48% ของจำนวนต้นทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ผลการทดสอบ ในเมล่อน พบว่า อาการของโรคปรากฏได้ทุกระยะการเจริญเติบโตและปรากฏลักษณะอาการเช่นเดียวกับในแตงโม แต่อาการรุนแรงกว่า โดยพบการเกิดโรคไม่ต่ำกว่า 50% ทั้งนี้ พบว่าหลังการเก็บเมล็ดติดเชื้อเป็นเวลา 10 เดือน เมล่อนสามารถแสดงอาการของโรคในระยะกล้าและระยะออกดอกได้ถึง 76.92 และ 86.44% ของจำนวนต้นทั้งหมด ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองตารางที่ 3 และ4 จะเห็นว่า ทั้งเมล็ดแตงโมและเมล่อนที่ติดเชื้อซึ่งเก็บไว้มากกว่า 2 เดือนขึ้นไป เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจะปรากฏรุนแรงกว่าเดือนเริ่มต้นซึ่งทำการปลูกทดสอบในเดือนพฤศจิกายนซึ่งเป็นช่วงอากาศเย็นจึงไม่เหมาะสมกับการลุกลามของโรค ทั้งนี้เนื่องจากโรคนี้จะพัฒนาและลุกลามอย่างรวดเร็วในสภาพที่มีความชื้นสูงและอากาศค่อนข้างอบอุ่น (.....)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาการมีชีวิตรอด การอาศัยอยู่ และการศึกษาจำนวนประชากรแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* (Aac) บนเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง พบว่า แบคทีเรีย Aac สามารถอาศัยอยู่บนเมล็ดแตงโมและเมล่อนได้ไม่ต่ำกว่า 10 เดือน โดยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียลดลงเล็กน้อย และยังสามารถถ่ายทอดโรคได้ไม่ต่ำกว่า 50% ของจำนวนเมล็ดทั้งหมดเมื่อนำเมล็ดไปปลูก

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา บุญวัฒน์. 2537. โรคผลเน่า :ปัญหาใหม่ของแตงโม. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา.4:20

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วนิดา ฐิตะฐาน. 2540. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2540 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วงศ์ บุญสืบสกุล วนิดา ฐิตะฐาน และรุ่งนภา คงสุวรรณ์. 2540. การผลิตแอนติซีรัมโดยวิธี Glutaraldehyde Fixed Cells เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าของแตงโม. รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2540 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Block, C.C. and L.M.Shepherd . 2009. Long-term Survival and Seed Transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *Citrulli* in Melon and Watermelon Seed. Phytopathology. 99:119.

Frankle, W.G., D.L. Hopkins and R.E. Stall. 1993. Ingress of the watermelon fruit blotch bacterium into fruit. Plant Dis. 77: 1090-1092.

Hopkins, D.L, T. Kucharek, D. Gay, R. Gitaitis, W. Cook and A. Keirath. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon. Report of Asgrow Seed Company. USA. 3 p.

Hu, F.P., J.M. Young and C.M. Triggs. 1991. Numerical analysis and determinative test for nonfluorescent plant-pathologenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseumonas avenae* Manns 1909. Int. J. Syst. Bacteriol. 41. 516-525.

Jacobs, J.L., J.P. Damicone and B.D. Mcgraw. 1992. First Report of bacterial fruit blotch of watermelon in Oklahoma. Plant Dis. 76: 1185.

Latin, R.X. and K.K. Rane. 1990. Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. Plant Dis. 74: 331.

Rane, K.K. and R.X. Latin. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon : Association of the pathogen with seed . Plant Dis. 76: 509-512.

Hidebrand, D.C., M.N. Scroth and D.C. Sands. 1988. Part C. *Pseudomonas* . p. 60 - 80 *In*: Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. (N.W. Schaad, Eds.). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.

Schaad, N.W., G.Jr. Sowell, R.W. Goth, R.R. Colwell and R.E. Webb. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov.. Int. J. Syst. Bacteriol.28:117-125.

Somodi, G.C., J.B. Jones, D.L. Hopkins, R.E. Stall, T.A. Kucharek, N.C. Hodge and J.C. Watterson. 1991. Occurrence of a bacterial watermelon fruit blotch in Florida. Plant Dis. 75: 1053-1056.

Sowell, G.Jr. and N.W. Schaad. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subp. *citrulli.* on watermelon : Seed transmission and resistance of plant introductions. Plt. Dis. Rept. 63 : 437-441.

Wall, G.C., V.M. Santos, F.J. Cruz and D.A. Nelson. 1990. Outbreak of watermelon fruit blotch in the Mariana Islands. Plant Dis. 74:80.

Willems, A., M. Goor, S. Thielemans, M. Gillis, K. Kersters and J. De Ley. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Psuedomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovarax* a*venae* subsp. a*venae* subsp.nov. comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax* a*venae* subsp. *cattleyae*, and *Acidorovax konjaci*. Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 107-119.

ตารางที่ 1 ปริมาณเมล็ดแตงโมที่ตรวจพบแบคทีเรีย *Acidovorax avanae avenae* subsp. c*itrulli* (Aac) ที่มีชีวิต หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 10 เดือน ตรวจผลบนอาหาร Tween agar

เดือนที่[1/]	**เปอร์เซนต์เมล็ดที่ตรวจพบ Aac ที่มีชีวิต**
0 (พ.ย. 51)	98[2/]
1 (ธ.ค. 51)	96
2 (ม.ค. 52)	96
3 (ก.พ. 52)	93
4 (มี.ค. 52)	94
5 (เม.ย. 52)	96
6 (พ.ค. 52)	92
7 (มิ.ย. 52)	95
8 (ก.ค. 52)	96
9 (ส.ค. 52)	80
10 (ก.ย. 52)	60

[1/] ระยะเวลาเก็บเมล็ดติดเชื้อ 2/ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น

ตารางที่ 2 ปริมาณเมล็ดเมล่อนที่ตรวจพบแบคทีเรีย *Acidovorax avanae avenae* subsp. c*itrulli* (Aac) ที่มีชีวิต หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 10 เดือน ตรวจผลบนอาหาร Tween agar

เดือนที่[1/]	**เปอร์เซนต์เมล็ดที่ตรวจพบ Aac ที่มีชีวิต**
0 (พ.ย. 51)	84[2/]
1 (ธ.ค. 51)	83
2 (ม.ค. 52)	84
3 (ก.พ. 52)	80
4 (มี.ค. 52)	82
5 (เม.ย. 52)	81
6 (พ.ค. 52)	83
7 (มิ.ย. 52)	81
8 (ก.ค. 52)	84
9 (ส.ค. 52)	84
10 (ก.ย. 52)	60

[1/] ระยะเวลาเก็บเมล็ดติดเชื้อ 2/ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากแบคทีเรีย *Acidovorax avanae avenae* subsp. c*itrulli* บนพืชแตงโมในระยะกล้าและระยะออกดอก

เดือนที่	**เปอร์เซนต์การเกิดโรค**	
	ระยะกล้า	**ระยะออกดอก**
0 (พ.ย. 51)	10.01	22.19
2 (ม.ค. 52)	10.69	35.01
4 (มี.ค. 52)	8.45	64.16
6 (พ.ค. 52)	21.05	50.94
8 (ก.ค. 52)	21.28	65.00
10 (ก.ย. 52)	62.79	78.48

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การเกิดโรคผลเน่าที่เกิดจากแบคทีเรีย *Acidovorax avanae avenae* subsp. C*itrulli* บนพืชเมล่อนในระยะกล้าและระยะออกดอก

เดือนที่	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**	
	ระยะกล้า	**ระยะออกดอก**
0 (พ.ย. 51)	52.78	66.09
2 (ม.ค. 52)	59.40	71.17
4 (มี.ค. 52)	69.12	64.10
6 (พ.ค. 52)	85.94	90.63
8 (ก.ค. 52)	62.50	82.22
10 (ก.ย. 52)	76.92	86.44

การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในไม้น้ำและไม้ดอกไม้ประดับ

Surveillance of of *Radopholus similis* in Aquatic Plant and Ornamental Plant

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1/] วานิช คำพานิช[2/]
กลุ่มวิจัยโรคพืช[1/] กลุ่มวิจัยการกักกันพืช[2/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การสุ่มเก็บไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ของฟาร์มปลูกพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกในเขตกรุงเทพมหานคร โดยทำการเก็บตัวอย่างต้นไม้น้ำพร้อมรากจำนวน 10 ตัวอย่าง (บ่อปลูก) ตัวอย่างละ 10 ต้น/บ่อ รวม 100 ต้น/เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม-เดือนกันยายน 2551 เป็นเวลา 9 เดือน ตรวจแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชโดยใช้เทคนิค Mist chamber ผลการตรวจและนับจำนวนพบไส้เดือนฝอย *R. similis* ในบ่อปลูกไม้น้ำแพร่ระบาดตั้งแต่ระดับ 0-20 % ของพื้นที่สุ่ม โดยตรวจพบ *R. similis* ในรากไม้น้ำสูงที่สุดในเดือนมกราคมและมิถุนายน 2551 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นการแพร่ระบาดเท่ากับ 20 % และพบจำนวน *R. similis* ในรากสูงที่สุดในเดือนมีนาคม 2551 จำนวน 36 ตัว/ราก 10 ต้น/1 ตัวอย่าง รองลงมาคือ เดือนเมษายน 2551 จำนวน 28 ตัว/ราก 10 ต้น/1 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน 2551 คิดเป็นค่าเฉลี่ยการแพร่ระบาดของประชากรไส้เดือนฝอย *R. similis* เท่ากับ 7.78 % ในระยะเวลา 9 เดือน

การสุ่มเก็บพรรณไม้น้ำของฟาร์มปลูกเพื่อการส่งออกในเขตจังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างต้นและรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. และไม้น้ำสกุลอื่นๆ ทุก 2 เดือน คือเดือนตุลาคม ธันวาคม 2551 กุมภาพันธ์ เมษายน มิถุนายน และสิงหาคม 2552 รวม 6 ครั้ง ครั้งละ 50 ชนิด ชนิดละ 10 ต้น รวม 500 ต้น/เดือน ตรวจแยกไส้เดือนฝอยโดยใช้เทคนิค mist chamber และการใช้คลื่นเสียง พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. เท่ากับ 80 80 20 30 0 และ 0 % ของตัวอย่างที่ตรวจในแต่ละเดือน เฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบเท่ากับ 16 32 53 36 0 และ 0 ตัว/ราก 10 กรัม ที่ตรวจในแต่ละเดือน ตามลำดับ สำหรับพรรณไม้น้ำสกุลอื่นๆ ตรวจพบไส้เดือนฝอย *R.similis* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Bacopa* spp.และ *Ceratopteris* spp., ในเดือนธันวาคม 2551 จำนวน 10 และ 10 % ของตัวอย่างที่ตรวจ ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 07015101

คำนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (plant parasitic nematodes) จัดเป็นจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชที่สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกพืชทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ พบแพร่ระบาดในหลายประเทศทั่วโลก และในปัจจุบันไส้เดือนฝอยศัตรูพืชมีบทบาทสำคัญต่อการกักกันพืชระหว่างประเทศเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะการตรวจสอบเพื่อกักกันไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดที่มีความสำคัญและยังไม่มีการแพร่กระจายเข้ามาสู่ประเทศนั้นๆ ในขณะเดียวกันการส่งออกพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชอื่นๆ ไปขายยังต่างประเทศ ต้องมีความมั่นใจว่าปลอดจากไส้เดือนฝอยต้องห้ามอย่างแท้จริง เพื่อลดการกีดกันทางการค้าที่อาจเกิดขึ้นได้ตามมา

ในการส่งออกพืชของประเทศไทยไปยังต่างประเทศยังคงประสบปัญหาเรื่อง การตรวจสอบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกันของประเทศนั้นๆ เช่นกัน ตัวอย่างของปัญหาที่เกิดขึ้นบ่อยครั้งคือ การติดไปของไส้เดือนฝอย burrowing nematode *(Radopholus similis*) กับพืชส่งออกจากประเทศไทยไปยังต่างประเทศ (นุชนารถ, 2551)

ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชบางชนิดต้องมีการควบคุมการนำเข้าและนำผ่าน ซึ่งกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้ประกาศให้ไส้เดือนฝอยดังต่อไปนี้เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย คือ *Anguina agrostis*, *A. graminis*, *A. tritici*, *Aphelenchoides arachidis*, *A. besseyi*, *Belonolaimus longicaudatus*, *Bursaphelenchus xylophilus*, *Cactodera cacti*, *Ditylenchus destructor*, *D. dipsaci*, *Dolichodorus heterocephalus*, *Globodera pallida*, *G. rostochiensis*, *Heterodera avenae*, *H. glycines*, *H. graminis*, *H. oryzicola*, *H. punctata*, *H. sorghi*, *H. trifolii*, *Hirschmanniella miticausa*, *Hoplolaimus columbus*, *Longidorus sylphus*, *Meloidogyne brevicauda*, *M. camielliae*, *M. chitwoodi*, *M. coffeicola*, *M. graminis*, *Nacobbus aberrans*, *Paratrichodorus porosus*, *Pratylenchus goodeyi*, *P. loosi*, *Rhadinaphelenchus cocophilus*, *Rotylenchulus macrodoratus*, *Scutellonema bradys*, *Trichodorus viruliferus*, *Xiphinema diversicaudatum* (นุชนารถ และ สุรพล, 2549)

ไส้เดือนฝอย *Anguina tritici* สามารถติดมากับเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ไรน์ โอ๊ต และข้าวสาลี (Evan *et al*., 1993) *A. tritici* เป็น sedentary endoparasite ที่เข้าทำลายต้นกล้าของธัญพืช และก่อให้เกิดอาการหงิกงอและการเจริญเติบโตที่ลดลงของต้นกล้า ไส้เดือนฝอยชนิดนี้สามารถเข้าทำลายรวงและเมล็ดธัญพืช ซึ่งมีผลทำให้เกิดปมที่เมล็ดและขนาดของเมล็ดธัญพืชลดลง

Aphelenchoides besseyi สามารถทำให้เกิดโรค white tip ในข้าว และมีการกระจายตัวทั่วไปในเขตที่มีการปลูกข้าวทั่วโลก (Katsumi and Shigeru, 2001) การตรวจพบไส้เดือนฝอยชนิดนี้ที่ติดมากับเมล็ดข้าวในรัฐแคลิฟอร์เนียเมื่อไม่นานมานี้ มีผลทำให้เกิดความกังวลกับผู้ที่มีส่วน

เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมข้าวในรัฐแคลิฟอร์เนียเป็นอย่างมาก *A. besseyi* เป็นไส้เดือนฝอยต้องห้ามของรัฐบาลกลางสหรัฐอเมริกา โดยเมล็ดข้าวที่มีเปลือกที่จะนำเข้าอเมริกาจะต้องได้รับการรับรองว่าปลอดจากไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าว ในขณะเดียวกันรัฐบาลตุรกีก็ประกาศว่าข้าวที่นำเข้าตุรกีจากสหรัฐอเมริกาต้องปลอดจากไส้เดือนฝอยชนิดนี้เช่นกัน นอกจากนั้น *A. besseyi* สามารถเข้าทำลายสตรอเบอร์รี่และทำให้เกิดโรค “summer dwarf” หรือ “crimp” ในสหรัฐอเมริกาและออสเตรเลีย *A. besseyi* มีพืชอาศัยกว้าง ยกตัวอย่างเช่น หอม กระเทียม ข้าวโพดหวาน ถั่วเหลือง และพืชผักหลายชนิด มีความสามารถในการอยู่รอดภายในเปลือกข้าวในสภาพขาดน้ำ (anhydrobiosis) เป็นเวลานานกว่า 3 ปี และเข้าทำลายพืชในลักษณะเป็น ectoparasite

A. fragariae เป็นไส้เดือนฝอยในสกุล *Aphelenchoides* อีกชนิดที่เข้าทำลายพืชพวกอัลฟัลฟา สตรอเบอร์รี่ และไม้ดอกไม้ประดับอีกหลายชนิด (Ganpati and Parwinder, 2004) ต้นสตรอเบอร์รี่ที่ถูกไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลายจะมีอาการแคระแกร็น ใบบิดเบี้ยวมีขนาดเล็กและใบเปลี่ยนเป็นสีแดง *A. fragariae* ดำรงชีวิตเป็นแบบ ectoparasite ของเนื้อเยื่อเจริญของสตรอเบอร์รี่ นอกจากนี้ยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาพขาดน้ำและที่อุณหภูมิต่ำได้อีกด้วย พบได้ทั้งในเขตหนาวและเขตร้อนทั่วโลก

Ditylenchus dipsaci คือไส้เดือนฝอยที่สามารถติดมากับหอม กระเทียม อัลฟัลฟา ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (Evan *et al*., 1993) *D. dipsaci* มีการกระจายตัวอยู่ทั่วโลก แต่ทำความเสียหายกับพืชในเขตหนาวเป็นส่วนใหญ่ การเข้าทำลายพืชเป็นแบบ endoparasite โดยตัวอ่อนระยะที่ 4 จะเข้าทำลายต้นกล้าโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ต้นกล้ายังไม่พ้นผิวดิน เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายต้นกล้าพืชได้แล้ว ตัวอ่อนของ *D. dipsaci* จะปลดปล่อยเอนไซม์ pectinase ทำให้เซลล์พืชแยกออกจากกันและไส้เดือนฝอยสามารถเคลื่อนที่ผ่านไปได้ ในกรณีที่พืชถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายในปริมาณมาก พืชอาจตายหรือแคระแกร็น ไส้เดือนฝอย *D. dipsaci* สามารถเข้าทำลายพืชโดยตรง (direct penetration) หรือการเข้าทำลายผ่านทางรูเปิดของปากใบ (stomata)

ไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* เป็นไส้เดือนฝอยกักกันที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่พบในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนทั่วโลก (Fogain, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งที่มีการปลูกกล้วย ประเทศที่พบ ได้แก่ ทุกประเทศในทวีปอัฟริกา บางประเทศในทวีปเอเชีย อเมริกากลางและใต้ ประเทศคิวบา ออสเตรเลีย และในหลายประเทศในทวีปยุโรป ในสหรัฐอเมริกา ไส้เดือนฝอย *R. similis* มีการกระจายตัวในเขตภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเปอร์โตริโก และในรัฐฮาวาย (Sipes and Delate, 1996)

ไส้เดือนฝอย *R. similis* มีพืชอาศัยมากกว่า 600 ชนิด (Uchida *et al*., 2003) แต่พืชอาศัยที่สำคัญได้แก่ กล้วย และส้ม ที่ปลูกในเขตร้อน กล้วยจัดเป็นพืชอาศัยที่สำคัญอันดับหนึ่งของ

ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ โดยพบว่ากล้วยเกือบทุกสายพันธุ์สามารถเป็นพืชอาศัยของ *R. similis* พืชชนิดอื่น ๆ ที่จัดเป็นพืชอาศัย ได้แก่ มะพร้าว ขิง ปาล์ม อโวกาโด กาแฟ พริกไทย อ้อย ชา พืชผักและไม้ดอกไม้ประดับ หญ้า และวัชพืชหลายชนิด

ไส้เดือนฝอย *R. similis* สามารถครบวงจรชีวิตได้ภายในส่วนของ cortex พืช วงจรชีวิตของ *R. similis* ในพืชพวกส้ม พบว่า ตัวอ่อนฟักออกจากไข่ภายในระยะเวลา 3 ถึง 7 วัน และไส้เดือนฝอยครบวงจรชีวิตภายใน 18 ถึง 20 วัน ที่ 24 ถึง 26 องศาเซลเซียส (Evan *et al*., 1993) วงจรชีวิตของ *R. similis* จะนานมากขึ้นที่อุณหภูมิต่ำลง ตัวเมียของไส้เดือนฝอย *R. similis* จะวางไข่โดยเฉลี่ย 2 ฟองต่อวัน โดยทั่วไปแล้ว *R. similis* ต้องการตัวผู้เพื่อการผสมพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามในบางครั้งพบว่าตัวเมียของไส้เดือนฝอย สามารถออกไข่ได้โดยไม่มีการผสมพันธุ์จากตัวผู้ (parthenogenesis) ตัวผู้ของไส้เดือนฝอยชนิดนี้ไม่มีการเข้าทำลายและดูดกินน้ำเลี้ยงจากรากพืช (Evan *et al*., 1993)

ไส้เดือนฝอย *R. similis* จัดเป็นศัตรูพืชแบบ migratory endoparasite และทำให้เกิดโรค spreading decline ในพืชพวกส้ม (Duncan and Cohn, 1990) โดยอาการดังกล่าวมักเกิดขึ้นหลังจากไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากแล้วหนึ่งปี ส้มที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะมีจำนวนใบและการเจริญเติบโตลดลง สีของใบมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะซีดลง และเกิดอาการ dieback ของกิ่งส้ม ใบของส้มอาจเหี่ยวในเวลากลางวันแต่จะกลับเป็นปกติเมื่อเวลาได้รับน้ำหรือเมื่อฝนตก ส้มจะให้ผลผลิตลดลงและผลที่ได้จะมีขนาดเล็กและมีลักษณะเหมือนขาดธาตุอาหาร ในรัฐฟลอริดาพบว่าไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำให้ผลผลิตของ grapefruit ลดลง 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของ orange พบว่า ไส้เดือนฝอยมีส่วนทำให้ผลผลิตลดลง 40 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ในพืชพวกอาโวกาโดก็เช่นเดียวกันพบว่า ผลผลิตลดลงเมื่อถูกไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลาย เมื่อทำการขุดรากที่ระดับความลึก 2.5 ฟุต จากระดับผิวดินพบว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของรากหาอาหาร (feeder roots) ได้ถูกทำลาย และเมื่อขุดลงไปลึกมากกว่านั้นพบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของรากที่พบได้ถูกทำลายโดยไส้เดือนฝอย ในกล้วยพบว่าการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำให้เกิดอาการโค่นล้มของต้นกล้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นที่กำลังให้ผลผลิต เนื่องจากระบบรากได้ถูกทำลาย ในส่วนของรากพบว่าเกิดอาการเน่า (lesion) สีน้ำตาลหรือสีดำที่บริเวณจุดที่ไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย เมื่อไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ผ่านชั้น cortex ของรากพืช ทำให้เกิดโพรง และเปิดทางให้เชื้อโรคในดิน เช่น *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* เข้าทำลายรากพืชซึ่งทำให้เกิดอาการรุนแรงมากยิ่งขึ้น (Sipes *et al*., 2001)

ในประเทศไทย มีรายงานการสำรวจพบ *R. similis* ในพริกไทย และกล้วย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2506 แต่ไม่มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอยชนิดนี้ เนื่องจากบ้านเราไม่เคยประสบปัญหาความเสียหายในพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ในปัจจุบัน *R. similis* สร้างปัญหาให้กับพืช

ส่งออกไปยังกลุ่มสหภาพยุโรปหรือ EU มีการเผาทำลายทันที ณ ประเทศปลายทาง และ/หรือ บางกรณีปฏิเสธการนำเข้า เนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. โดยในปี พ.ศ. 2550-2551 ไม้น้ำจากประเทศไทยถูกเผาทำลายไป 11 ครั้ง ทำให้มีผลกระทบต่อธุรกิจการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทยเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังพบไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* spp. ในไม้น้ำที่ส่งไปประเทศโปแลนด์ถูกเผาทำลายด้วยเช่นกัน (นุชนารถ, 2551)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุ-อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดินและรากพืช ได้แก่ ถุงพลาสติก ป้ายติดถุงตัวอย่าง พลั่วมือ

2. เครื่องพ่นหมอก (Mist chamber)

3. เครื่องนับไส้เดือนฝอยและวัสดุ-อุปกรณ์การตรวจแยกไส้เดือนฝอย ได้แก่ จานแก้วชนิด Syracuse ที่มีช่องตารางตรวจนับ บีกเกอร์ กรวยแก้ว กรวยพลาสติก คลิ๊ปหนีบ และสายยาง

4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Compound microscope และ Stereo microscope

วิธีการ

1. เลือกบ่อปลูกพรรณไม้น้ำของผู้ประกอบการไม้น้ำส่งออกในเขตกรุงเทพมหานคร และจ. นครราชสีมา โดยสุ่มเลือกจากบ่อปลูกไม้น้ำเก่า

2. ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. พร้อมรากจากแหล่งผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกเขตกรุงเทพมหานคร เดือนละ 1 ครั้ง จำนวน 10 ตัวอย่างๆ ละ 10 ต้น/บ่อ รวม 100 ต้น เริ่มมกราคม-สิงหาคม 2551 รวม 8 ครั้ง

3. ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นไม้น้ำพร้อมรากจากแหล่งผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกเขต จ. นครราชสีมา ทุก 2 เดือน จำนวนพรรณไม้น้ำ 50 ชนิด ชนิดละ 10 ต้น รวม 500 ต้น เริ่มสุ่มเก็บเดือนตุลาคม ธันวาคม 2551 กุมภาพันธ์ เมษายน มิถุนายน และสิงหาคม 2552

4. นำรากไม้น้ำแต่ละตัวอย่างมาแยกไส้เดือนฝอย 2 วิธี คือ 1) วิธีพ่นหมอกด้วยเครื่อง Mist chamber และวิธีใช้คลื่นเสียงด้วยเครื่อง Ultrasonic ตามเทคนิคดังต่อไปนี้ :-

<u>วิธีการตรวจแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชปนเปื้อนในรากไม้น้ำ</u>

1. วิธีพ่นหมอก (Mist chamber)

การตรวจแยกไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ที่อาศัยอยู่ในรากในลักษณะ Endoparasite ออกจากรากไม้น้ำ โดยใช้เครื่อง Mist chamber (นุชนารถ และ วานิช, 2551) เป็นวิธีแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชด้วยการพ่นน้ำเป็นฝอยลงบนรากพืช ความชื้นของละอองน้ำทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกจากรากพืชลงสู่ปลายกรวย (ภาพที่ 1)

มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้ :-

1. การเตรียมตัวอย่างรากไม้น้ำ ทำการตัดรากไม้น้ำถึงโคนต้น จากนั้นตัดย่อยรากให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปใส่ในถุงผ้ากรองชนิดเนื้อผ้าละเอียด น้ำหนักรากประมาณ 10 กรัม/1 ตัวอย่าง/1 ถุง

2. การเตรียมกรวยแยก นำกรวยแก้วต่อสายยางที่ก้านกรวยและใช้คลิ๊ปหนีบสายยาง เทน้ำสะอาดใส่ลงไปในกรวย นำไปตั้งวางในเครื่อง Mist chamber จากนั้นนำตัวอย่างรากที่อยู่ในถุงผ้าวางบนตะแกรงลวดที่อยู่บนกรวยพลาสติก นำไปซ้อนบนกรวยแก้ว

3. เปิดเครื่อง Mist chamber ปล่อยน้ำตามท่อสายยางผ่านหัวพ่นฝอย ที่ติดตั้งไว้ด้านบนของกรวย เปิดเครื่องพ่นฝอยตลอด 48 ชม. หลังจากนั้นไขน้ำจากปลายสายยางกรวยแก้วใส่ภาชนะแก้วใสหรือบีกเกอร์ ในปริมาตรน้ำ 50 มล.

4. นำไปตรวจหาไส้เดือนฝอยภายใต้กล้อง Stereo microscope กำลังขยายอย่างน้อย 70 เท่า

2. วิธีใช้คลื่นเสียง (Ultrasonic)

เป็นการใช้คลื่นเสียงที่ความถี่ 50/60 KHz เป็นเวลา 10 นาที โดยผ่านตัวกลางน้ำไปกระทบรากพืชและคลื่นเสียงไปรบกวนให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมานอกราก มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างดังนี้ :-

นำส่วนของต้นไม้น้ำจำนวน 5 ต้น ใส่ในบีกเกอร์แก้วและเติมน้ำท่วมระบบราก นำไปตั้งวางในอ่างของเครื่อง Ultrasonic ที่บรรจุน้ำสูงเหนือระดับรากไม้น้ำที่อยู่ในบีกเกอร์ ทำการเปิดเครื่องเป็นเวลา 10 นาที ปิดเครื่องและนำน้ำไปผ่านตะแกรงละเอียดขนาด 400 mesh แยกได้ไส้เดือนฝอยที่อยู่บนตะแกรงไปตรวจนับจำนวน *R. similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2550 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ 1) B&B Aquarium Co., Ltd. ผู้ประกอบการไม้น้ำส่งออก กรุงเทพมหานคร

2) Aquatic Plant Center Co., Ltd. ผู้ประกอบการไม้น้ำส่งออก จ.นครราชสีมา

ภาพที่ 1 การเตรียมตัวอย่างรากไม้น้ำเพื่อตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Mist chamber

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในฟาร์มผลิตไม้น้ำส่งออก พื้นที่ปลูก กรุงเทพมหานคร

จากการสุ่มเก็บไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ของฟาร์มปลูกไม้น้ำในเขตกรุงเทพมหานคร (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นแหล่งผลิตพรรณไม้น้ำส่งออกรายใหญ่จำหน่ายไปยังกลุ่มสหภาพยุโรป (EU) โดยทำการเก็บตัวอย่างต้นไม้น้ำพร้อมรากจำนวน 10 ตัวอย่าง (บ่อปลูก) ตัวอย่างละ 10 ต้น/บ่อ รวม 100 ต้น/เดือน เริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม-เดือนกันยายน 2551 เป็นเวลา 9 เดือน โดยการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชด้วยเทคนิค Mist chamber ผลการตรวจและนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ในบ่อปลูกไม้น้ำมีการแพร่ระบาดตั้งแต่ระดับ 0-20 % ของพื้นที่สุ่ม โดยตรวจพบ *R. similis* ในรากไม้น้ำสูงที่สุดในเดือนมกราคมและมิถุนายน 2551 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็นการแพร่ระบาดเท่ากับ 20 % และพบจำนวน *R. similis* ในรากสูงที่สุดในเดือนมีนาคม 2551 จำนวน 36 ตัว/ราก 10 ต้น/1 ตัวอย่าง รองลงมาคือ เดือนเมษายน 2551 จำนวน 28 ตัว/ราก 10 ต้น/1 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม สิงหาคม และกันยายน 2551 (ตารางที่ 1)

การตรวจพบไส้เดือนฝอย *R. similis* ในแหล่งผลิตพรรณไม้น้ำส่งออกไปประเทศในกลุ่ม EU คิดเป็นค่าเฉลี่ยการแพร่ระบาดของประชากรไส้เดือนฝอย เท่ากับ 7.78 % ระยะเวลา 9 เดือน เป็นข้อมูลการตรวจพบที่ไม่สูงมาก เนื่องจากบางเดือนตรวจไม่พบ ซึ่งอาจเป็นผลจากจำนวนตัวอย่างสุ่มมีปริมาณน้อย โดยสามารถสุ่มตรวจได้จำนวน 10 บ่อปลูก/ครั้ง/เดือน เท่านั้น จากจำนวนบ่อรวม 300 บ่อ คิดเป็นการสุ่มตรวจเพียง 3.33 % ของพื้นที่ปลูก เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องของราคาต้นไม้น้ำที่มีราคาสูง (ราคาจำหน่ายไป EU ต้นละ 1 US $) และต้นไม้น้ำที่นำมาตรวจแยกไส้เดือนฝอยด้วยเทคนิค Mist chamber ไม่สามารถนำกลับไปปลูกใหม่ได้ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจพบไส้เดือนฝอยจำนวนน้อยหรือมากนั้น ยังคงมีความสำคัญต่อการเฝ้าระวังไส้เดือนฝอย *R. similis* ในแหล่งผลิตเพื่อการส่งออกพรรณไม้น้ำโดยเฉพาะไปประเทศในกลุ่ม EU ซึ่งต้องหาวิธีในการกำจัดไส้เดือนฝอยไม่ให้ติดไปกับรากพืช และต้องหาวิธีการควบคุมไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดจากบ่อสู่บ่อปลูกอื่นๆ อีกด้วย

ภาพที่ 2 ฟาร์มผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออก ในเขตกรุงเทพมหานคร

ตารางที่ 1 จำนวนไส้เดือนฝอย *Radopholus similia* ในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. จากบ่อปลูกไม้น้ำในเขตกรุงเทพมหานคร

เดือน 2551	จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บ[1/]	จำนวนตัวอย่างที่พบ (จำนวนไส้เดือนฝอย *R. similis*)	คิดเป็น %
มกราคม	10	2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1 = 4 ตัว ตัวอย่างที่ 2 = 6 ตัว)	20
กุมภาพันธ์	10	ไม่พบ	-
มีนาคม	10	1 ตัวอย่าง (จำนวน 36 ตัว)	10
เมษายน	10	1 ตัวอย่าง (จำนวน 28 ตัว)	10
พฤษภาคม	10	1 ตัวอย่าง (จำนวน 12 ตัว)	10
มิถุนายน	10	2 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1 = 5 ตัว ตัวอย่างที่ 2 = 7 ตัว)	20
กรกฎาคม	10	ไม่พบ	-
สิงหาคม	10	ไม่พบ	-
กันยายน	10	ไม่พบ	-

[1/] 1 ตัวอย่าง เท่ากับ 10 ต้น

2. การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในฟาร์มผลิตไม้น้ำส่งออก พื้นที่ปลูก จ. นครราชสีมา

จากการสุ่มเก็บพรรณไม้น้ำของฟาร์มปลูกเพื่อการส่งออกในเขตจังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างต้นและรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. และไม้น้ำสกุลอื่นๆ ทุก 2 เดือน คือเดือนตุลาคม ธันวาคม 2551 กุมภาพันธ์ เมษายน มิถุนายน และสิงหาคม 2552 รวม 6 ครั้ง ครั้งละ 50 ชนิด ชนิดละ 10 ต้น รวม 500 ต้น/เดือน ตรวจแยกไส้เดือนฝอยโดยใช้เทคนิค mist chamber และการใช้คลื่นเสียง พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. เท่ากับ 80 80 20 30 0 และ 0 % ของตัวอย่างที่ตรวจในแต่ละเดือน เฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบเท่ากับ 16 32 53 36 0 และ 0 ตัว/ราก 10 กรัม ที่ตรวจในแต่ละเดือน ตามลำดับ (ตารางที่ 2) สำหรับพรรณไม้น้ำสกุลอื่นๆ ตรวจพบไส้เดือนฝอย *R.similis* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Bacopa* spp.และ *Ceratopteris* spp., ในเดือนธันวาคม 2551 จำนวน 10 และ 10 % ของตัวอย่างที่ตรวจ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 จำนวนไส้เดือนฝอย *Radopholus similia* ในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. จากบ่อปลูกไม้น้ำในเขตจังหวัดนครราชสีมา

เดือน/ปี	จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บ[1/]	จำนวนตัวอย่างที่พบ (จำนวนไส้เดือนฝอย *R. similis*)	คิดเป็น %
ตุลาคม 51	10	8 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 16 ตัว)	80
ธันวาคม 51	10	8 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 32 ตัว)	80
กุมภาพันธ์ 52	10	2 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 53 ตัว)	20
เมษายน 52	10	3 ตัวอย่าง (เฉลี่ย 36 ตัว)	30
มิถุนายน 52	10	ไม่พบ	0
สิงหาคม 52	10	ไม่พบ	0

[1/] 1 ตัวอย่าง เท่ากับ 10 ต้น

ตารางที่ 3 จำนวนไส้เดือนฝอย *Radopholus similia* และไส้เดือนฝอยสกุลอื่นๆ ในรากพรรณไม้น้ำสกุลต่างๆ จากบ่อปลูกไม้น้ำในเขตจังหวัดนครราชสีมา

สกุลของพรรณไม้น้ำ	จำนวนไส้เดือนฝอย *R. similis*					
	ต.ค. 51	ธ.ค. 51	ก.พ. 52	เม.ย. 52	มิ.ย. 52	ส.ค. 52
ACORUS SPP.	-	-	-	-	-	-
AGLAONEMA SPP.	-	-	-	-	-	-
ALTERNANTHERA SPP.	-	-	-	-	-	-
AMMANIA SPP.	-	-	-	-	-	-
AMMORICIA AQUATICA	-	-	-	-	-	-
APONOGETON SPP.	-	-	-	-	-	-
BACOPA SPP.	-	Rado (1)	-	-	-	-
BARCLAYA SPP.	-	-	-	-	-	-
BOLBITIS SPP.	-	-	-	-	-	-
CABOMBA SPP.	-	-	-	-	-	-
CARDAMINE SPP.	-	-	-	-	-	-
CERATOPTERIS SPP.	-	Rado (1)	-	-	-	-
CRINUM SPP.	-	-	-	-	-	-
CRYPTOCORYNE SPP.	-	-	-	-	-	-
DRACAENA SPP.	-	-	-	-	-	-
ECHINODORUS SPP.	-	-	-	-	-	-
ELODEA SPP.	-	-	-	-	-	-
EUSTRALIS SPP.	-	-	-	-	-	-
GYMNOCORONIS SPP.	-	-	-	-	-	-
HEMIGRAPHIS SPP.	-	-	-	-	-	-
HYDROCOTYLE SPP.	-	-	-	-	-	-
HYGROPHILA SPP.	-	-	-	-	-	-
LILAEOPSIS SPP.	-	Praty (1)	-	-	-	-
LIMNOPHILA SPP.	-	-	-	-	-	-
LOBELIA SPP.	-	-	-	-	-	-
LUDWIGIA SPP.	-	-	-	-	-	-
MAYACA SPP.	-	-	-	-	-	-
MICRANTHEMUM SPP.	-	-	-	-	-	Meloi(12)
MICROSORIUM SPP.	-	-	-	-	-	-
MONOSOLENIUM SPP.	-	-	-	-	-	-
MYRIOPHYLLUM SPP.	-	-	-	-	-	-
NOMAPHILA SPP.	-	-	-	-	-	-
NYMPHAEA SPP.	-	-	-	-	-	-
OPHIOPOGON SPP.	-	-	-	-	-	-
RORIPPA SPP.	-	-	-	-	-	-
ROTALA SPP.	-	-	Hirsh (2)	-	-	-
SAGITTARIA SPP.	-	-	-	-	-	-
SAURURUS SPP.						
SPATHIPHYLLUM SPP.						
SYNGONIUM SPP.						
TRICHOCORONIS SPP.						
VALLISNERIA SPP.						
VESICULARIA SPP.						

Rado = *Radopholus similis* ; Praty = *Pratylenchus* sp. ; Meloi = *Meloidogyne* sp.

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการตรวจรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ณ แหล่งผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกในฟาร์มผลิตเขตกรุงเทพมหานคร มีจำนวนครั้งของการพบไส้เดือนฝอย *R. similis* เข้าทำลายราก คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.78 % ในระยะเวลา 9 เดือน และพบจำนวนไส้เดือนฝอยในรากพืชสูงที่สุดในช่วงเดือนมีนาคม 2551 จำนวน 36 ตัว/1 ตัวอย่าง/10 ต้น

ผลการตรวจรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. และไม้น้ำสกุลอื่นๆ พบไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. เท่ากับ 80 80 20 30 0 และ 0 % ของตัวอย่างที่ตรวจในแต่ละเดือน เฉลี่ยจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบเท่ากับ 16 32 53 36 0 และ 0 ตัว/ราก 10 กรัม ที่ตรวจในแต่ละเดือน ตามลำดับ สำหรับพรรณไม้น้ำสกุลอื่นๆ ตรวจพบไส้เดือนฝอย *R.similis* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Bacopa* spp.และ *Ceratopteris* spp., ในเดือนธันวาคม 2551 จำนวน 10 และ 10 % ของตัวอย่างที่ตรวจ ตามลำดับ

จากข้อมูลการตรวจพบไส้เดือนฝอยดังกล่าว ยังคงต้องเฝ้าระวังการแพร่ระบาดจากบ่อสู่บ่อปลูกอื่นๆ และเร่งหาวิธีการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย *R. similis* เพื่อลดปัญหาการเผาทำลายไม้น้ำจากประเทศไทย ณ ประเทศปลายทางอย่างเร่งด่วนต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ฟาร์มไม้น้ำบริษัท B&B Aquarium Co., Ltd. กรุงเทพมหานคร และ Aquatic Plant Center Co., Ltd. จ.นครราชสีมา อนุเคราะห์ตัวอย่างรากไม้น้ำเพื่อใช้ในงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2551. Burrowing Nematode ศัตรูพืชกักกันของไม้น้ำส่งออก. ข่าวอารักขาพืช 3(3) : 3.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ วานิช คำพานิช. 2551. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม “การพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่ติดมากับพืชนำเข้าและส่งออก”. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 26 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สุรพล ยินอัศวพรรณ. 2549. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน. ข่าวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 1(9) : 4.

Duncan, L. W., and E. Cohn. 1990. Nematode parasites of citrus. Pp. 321-346 in M. Luc, R.A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, U.K.

Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M. Webster. 1993. Chapter 1. Extraction, Identification and Control of Plant Parasitic Nematodes. in Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International, UK. 648 pages.

Fogain, R. 2000. Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa*, AAB). Nematology 32: 129-133.

Ganpati, G. B., and G. Parwinder. 2004. Effectiveness of a hot water drench for the control of foliar nematodes *Aphelenchoides fragariae* in floriculture. Nematology 36 : 49-53.

Katsumi, T., and H. Shigeru. 2001. Distribution pattern and mortality of the white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda : Aphelenchoididae), among rice seeds. Nematology 33 : 17-24.

Sipes, B.S., D.P. Schmitt, and S.C. Nelson. 2001. Burrowing nematode, a major pest in the tropics. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-21.

Sipes, B.S., and K. M. Delate. 1996. Potential of biologically-derived nematicides for control of anthurium decline. Nematropica 26 : 171-175.

Uchida, J.Y., B.S. Sipes, and C.Y. Kadooka. 2003. Burrowing nematode on anthurium: Recognizing symptoms, understanding the pathogen, and preventing disease. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-24

ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในไม้น้ำและไม้ดอกไม้ประดับ

Biology and Ecology of *Radopholus similis* in Aquatic Plant and Ornamental Plant

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1/] วานิช คำพานิช[2/]
กลุ่มวิจัยโรคพืช[1/] กลุ่มวิจัยการกักกันพืช[2/] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การศึกษาวงจรชีวิตและความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในพรรณไม้น้ำ โดยใช้ไส้เดือนฝอย *R. similis* ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในชิ้นแครอทสภาพปลอดเชื้อ ปลูกเชื้อในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ที่ปลูกในกล่องพลาสติกบรรจุทรายหยาบตั้งวางในระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 20 ตัว/ต้น เป็นเวลา 25 วัน พบตัวเต็มวัยเพศเมียของ *R. similis* เริ่มวางไข่ภายในราก โดยพบไข่ของไส้เดือนฝอยติดสีแดงของสีย้อม acid fuchsin เมื่อนำไปปลูกเชื้อในต้นไม้น้ำที่ปลูกในบ่อซีเมนต์จำนวน 100±10 ตัว/ต้น และทำการตรวจรากทุก 7 วันๆ ละ 5 ต้น โดยใช้เทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากด้วยคลื่นเสียง พบไส้เดือนฝอยเข้าสู่ระบบรากพืชทดสอบที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ และพบไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตในราก โดยพบเพศเมียและเพศผู้จำนวน 22 และ 8 ตัว ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ในวันที่ 21 และ 28 วัน พบไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ภายในรากพืช และเริ่มพบตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 รวมวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในไม้น้ำเท่ากับ 28 วัน

รหัสการทดลอง 07015101

คำนำ

Burrowing nematode (*Radopholus similis* Cobb, 1893; Thorne, 1949) เป็นศัตรูพืชกักกันของหลายประเทศ พบในแถบยุโรป อเมริกา และบางประเทศในเอเชีย เช่น เกาหลี และญี่ปุ่น ซึ่งแพร่ระบาดในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนทั่วโลก (Fogain, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งที่มีการปลูกกล้วย ได้แก่ ทุกประเทศในทวีปอัฟริกา บางประเทศในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย อเมริกาใต้ และบางรัฐของอเมริกา พบมีพืชอาศัยมากกว่า 600 ชนิด แต่พืชอาศัยที่สำคัญ ได้แก่ กล้วย และส้ม ที่ปลูกในเขตร้อน กล้วยจัดเป็นพืชอาศัยที่สำคัญอันดับหนึ่งของไส้เดือนฝอยชนิดนี้ โดยพบว่า กล้วยเกือบทุกสายพันธุ์สามารถเป็นพืชอาศัยของ *R. similis* พืชชนิดอื่นๆ ที่จัดเป็นพืชอาศัย ได้แก่ มะพร้าว ขิง ปาล์ม อโวกาโด กาแฟ พริกไทย อ้อย ชา พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ หญ้า และวัชพืชหลายชนิด (Uchida *et al*., 2003) ไส้เดือนฝอย *R. similis* มีลักษณะการทำลายแบบ endoparasite โดยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณท่อน้ำ-ท่ออาหารของรากพืช และเจริญเติบโตขยายพันธุ์อยู่ภายในรากจนครบวงจรชีวิต เริ่มจากตัวอ่อนระยะที่ 1 ฟักออกจากไข่ ใช้เวลา 3-7 วัน จากนั้นลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 3 และ 4 ตามลำดับ เจริญเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย และครบวงจรชีวิตในเนื้อเยื่อ พืชใช้เวลา 18-20 วัน ที่อุณหภูมิ 24-26 องศาเซลเซียส วงจรชีวิตนานมากขึ้น เมื่ออุณหภูมิต่ำลง ตัวเมียวางไข่โดยเฉลี่ย 2 ฟองต่อวัน ในบางครั้งพบว่าตัวเมียสามารถออกไข่ได้โดยไม่มีการผสมพันธุ์กับตัวผู้ (parthenogenesis) และตัวผู้ของไส้เดือนฝอยชนิดนี้จะไม่เข้าทำลายหรือดูดกินน้ำเลี้ยงจากรากพืช (Evan *et al*., 1993)

ไส้เดือนฝอย *R. similis* จัดเป็นศัตรูพืชแบบ migratory endoparasite และทำให้เกิดโรค spreading decline ในพืชพวกส้ม (Duncan and Cohn, 1990) โดยอาการดังกล่าวมักเกิดขึ้นหลังจากไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากแล้วหนึ่งปี ส้มที่ถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลายจะมีจำนวนใบและการเจริญเติบโตลดลง สีของใบมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะซีดลง และเกิดอาการ dieback ของกิ่งส้ม ใบของส้มอาจเหี่ยวในเวลากลางวันแต่จะกลับเป็นปกติเมื่อเวลาได้รับน้ำหรือเมื่อฝนตก ส้มจะให้ผลผลิตลดลงและผลที่ได้จะมีขนาดเล็กและมีลักษณะเหมือนขาดธาตุอาหาร ในรัฐฟลอริดาพบว่าไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำให้ผลผลิตของ grapefruit ลดลง 50 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของ orange พบว่า ไส้เดือนฝอยมีส่วนทำให้ผลผลิตลดลง 40 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ในพืชพวกอาโวกาโดก็เช่นเดียวกันพบว่า ผลผลิตลดลงเมื่อถูกไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลาย เมื่อทำการขุดรากที่ระดับความลึก 2.5 ฟุต จากระดับผิวดินพบว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของรากหาอาหาร (feeder roots) ได้ถูกทำลาย และเมื่อขุดลงไปลึกมากกว่านั้นพบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของรากที่พบได้ถูกทำลายโดยไส้เดือนฝอย ในกล้วยพบว่าการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *R. similis* ทำให้เกิดอาการโค่นล้มของต้นกล้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งต้นที่กำลังให้ผลผลิต เนื่องจากระบบรากได้ถูกทำลาย ในส่วน

ของรากพบว่าเกิดอาการเน่า (lesion) สีน้ำตาลหรือสีดำที่บริเวณจุดที่ไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย เมื่อไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ผ่านชั้น cortex ของรากพืช ทำให้เกิดโพรงและเปิดทางให้เชื้อโรคในดิน เช่น *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* เข้าทำลายรากพืชซึ่งทำให้เกิดอาการรุนแรงมากยิ่งขึ้น (Sipes *et al*., 2001)

ในประเทศไทย มีเพียงรายงานการสำรวจพบ *R. similis* ในพริกไทย และกล้วย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2506 (Timm, 1965) แต่ไม่มีรายงานความเสียหายและการป้องกันกำจัดที่เกิดจากไส้เดือนฝอยชนิดนี้ เนื่องจากบ้านเราไม่เคยประสบปัญหาความเสียหายในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ในปัจจุบัน *R. similis* สร้างปัญหาให้กับพืชส่งออกไปยังกลุ่มสหภาพยุโรปหรือ EU มีการเผาทำลายทันที ณ ประเทศปลายทาง และ/หรือบางกรณีปฏิเสธการนำเข้า เนื่องจากมีการตรวจพบ *R. similis* ในพรรณไม้น้ำสกุล *Anubias* spp. โดยในปี พ.ศ. 2550-2551 ไม้น้ำจากประเทศไทยถูกเผาทำลายไป 11 ครั้ง ทำให้มีผลกระทบต่อธุรกิจการส่งออกพรรณไม้น้ำของไทยเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังพบไส้เดือนฝอยสกุล *Hirschmanniella* spp. ในไม้น้ำที่ส่งไปประเทศโปแลนด์ ถูกเผาทำลายด้วยเช่นกัน (นุชนารถ, 2551) ดังนั้น จึงมีความจำเป็นในการศึกษาวิจัยด้านชีววิทยาและนิเวศวิทยา เพื่อทราบพืชอาศัยและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในไม้น้ำและไม้ดอก-ไม้ประดับ เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่วิธีการป้องกันกำจัด *R. similis* อย่างมีประสิทธิภาพและเหมาะสม ตลอดจนแก้ปัญหาการปนเปื้อนไปกับรากพืชส่งออกอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุ-อุปกรณ์การแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืช ได้แก่ เครื่องปั่น ตะแกรงแยกไส้เดือนฝอยขนาด 20 40 และ 200 mesh ชุดกรวยแก้วพร้อมคลิ๊ป บีกเกอร์ ตู้เขี่ยเชื้อ และ micropipette

2. วัสดุ-อุปกรณ์เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในชิ้นส่วนพืช ได้แก่ หัวแครอท สารฆ่าเชื้อ (แอลกอฮอล์ 75% และ 0.1 % Hyamine) จานเพาะเลี้ยงฆ่าเชื้อ และพาราฟิล์ม

3. วัสดุ-อุปกรณ์ในการปลูกพืชอาศัย ได้แก่ ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. กล่องสี่เหลี่ยมพลาสติกใสขนาด 18.5 x 27.5 x 10.0 ซม. บ่อซีเมนต์เส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ดินทรายหยาบนึ่งฆ่าเชื้อ และพลาสติกใส

4. วัสดุ-อุปกรณ์ในการตรวจ-นับจำนวนไส้เดือนฝอย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ Compound microscope และ Stereo microscope และเครื่อง Ultrasonic

5. วัสดุ-อุปกรณ์ในการย้อมสีราก ได้แก่ hot plate สีย้อม acid fuchsin สาร lactophenol

วิธีการ

การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำ

1.1 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท

1.1.1 การแยกไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากรากพืช นำรากพืชมาล้างผ่านน้ำไหลและทำการตัดรากให้มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นนำชิ้นรากใส่ลงในเครื่องปั่นพร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นลงไป ปั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 วินาที ทิ้งระยะเวลาห่างกันเล็กน้อย เท suspension ที่ได้จากการปั่นผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh เศษรากพืชขนาดใหญ่จะติดอยู่บนตะแกรง ไส้เดือนฝอยจะไหลไปกับน้ำผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะรองรับ เทน้ำที่มีไส้เดือนฝอยเก็บไว้ในบีกเกอร์ ต่อจากนั้นเทลงในตะแกรงลวดที่มีกระดาษทิชชูรองอยู่และนำมาตั้งวางบนกรวยที่มีน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชม. (ช่วงเวลานี้น้ำจะระเหย ดังนั้น suspension จะเริ่มแห้ง ไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนที่ลงสู่ปลายกรวยผ่านกระดาษทิชชูและรูของตะแกรง ซึ่งไส้เดือนฝอยหนักกว่าน้ำจึงทำให้ไส้เดือนฝอยตกลงไปอยู่บริเวณปลายกรวย) ทำการเก็บไส้เดือนฝอยจากบริเวณปลายกรวย โดยไขน้ำประมาณ 30 มล. ลงสู่บีกเกอร์ขนาด 50 มล.

1.1.2 การฆ่าเชื้อที่ผิวของไส้เดือนฝอย *R. similis* ปฏิบัติในสภาพปลอดเชื้อภายในตู้เขี่ยเชื้อ โดยนำไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำ 30 มล. ตั้งวางให้ตกตะกอนบริเวณก้นบีกเกอร์ แล้วใช้ micropipette ค่อยๆ ดูดน้ำบริเวณผิวน้ำทิ้งไป ให้เหลือน้ำที่มีไส้เดือนฝอยไม่เกิน 10 มล. จากนั้นเทสารละลาย ฆ่าเชื้อที่ผิวไส้เดือนฝอย (0.1 % Hyamine) ลงไปในอัตรา 1 : 1 ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วกวนน้ำประมาณ 1 นาที และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอน จากนั้นดูดน้ำบริเวณผิวน้ำทิ้งและล้าง-ตั้งตกตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง

1.1.3 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท ปฏิบัติในสภาพปลอดเชื้อภายในตู้เขี่ยเชื้อ พ่นแอลกอฮอล์ 75 % บนหัวแครอท จากนั้นนำหัวแครอทไปลนไฟจนกระทั่งแอลกอฮอล์ 75 % หมด (เปลือกเริ่มดำและแห้ง) ตัดปลายหัวแครอทออกและทำการปอกเปลือกแครอทลงลึกด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้ว เผามีดทุกครั้งหลังการปอกเปลือกแครอท จากนั้นนำมาตัดเป็นชิ้นวงกลม และนำแครอท 1-2 ชิ้น วางลงในจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารวุ้น 1.5 % ทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยลงในชิ้นแครอท โดยใช้ micropipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 หยดลงตรงบริเวณขอบของชิ้นแครอทที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยง จำนวน 100$\pm$10 ตัว/จาน ปิดฝาและปิดขอบฝาด้วยพาราฟิล์ม นำไปบ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิประมาณ 28°ซ เป็นเวลา 1 เดือน

1.1.4 การแยกล้างไส้เดือนฝอย *R. similis* ออกจากชิ้นแครอท นำชิ้นแครอทใส่ลงในเครื่องปั่นพร้อมทั้งเติมน้ำกลั่นลงไป ปั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 วินาที ทิ้งระยะเวลาห่างกันเล็กน้อย (ระยะเวลาของการปั่นขึ้นอยู่กับขนาดของชิ้นแครอท) เท suspension ผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เศษแครอทขนาดใหญ่จะติดอยู่บนตะแกรง ไส้เดือนฝอยจะไหลไปกับน้ำผ่านตะแกรงลงสู่ภาชนะรองรับ เทน้ำที่มีไส้เดือนฝอยเก็บไว้ในบีกเกอร์ ต่อจากนั้นเทลงในตะแกรงลวดที่มีกระดาษทิชชูรองอยู่และนำมาตั้งวางบนกรวยที่มีน้ำกลั่น เป็นเวลา 24 ชม. ทำการเก็บไส้เดือนฝอยจากบริเวณปลายกรวย โดยไขน้ำประมาณ 50 มล. ลงสู่บีกเกอร์ เพื่อเตรียมนับจำนวนไส้เดือนฝอยสำหรับการปลูกเชื้อในต้นพืชอาศัยต่อไป

1.2 การปลูกพืชอาศัย (ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp.)

1.2.1 การปลูกในกล่องพลาสติก นำต้นไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ปลูกลงในกล่องสี่เหลี่ยมพลาสติกใสขนาด 18.5 x 27.5 x 10.0 ซม. ซึ่งบรรจุดินทรายหยาบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มีความสูงจากพื้นกล่องเท่ากับ 3 ซม. จำนวน 20 ต้น/กล่อง จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ท่วมโคนต้นไม้น้ำประมาณ 3 ซม. ปิดฝากล่องด้วยพลาสติกใสและเจาะรูระบายอากาศ (ภาพที่ 1) นำไปตั้งวางในห้องปกติ ดูแลเติมน้ำกลั่นทุก 7 วัน

ภาพที่ 1 การปลูกไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. เพื่อใช้เป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชกักกัน *Radopholus similis*

1.2.2 การปลูกในบ่อซีเมนต์ เตรียมบ่อซีเมนต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร ทำการบรรจุวัสดุปลูก (ดินทรายหยาบ) ในบ่อที่ตั้งวางในโรงเรือน จากนั้นปลูกไม้น้ำ *Anubias* sp. ลงในบ่อ 20 ต้น/บ่อ ใช้พลาสติกคลุมปิดปากบ่อ ปลูกดูแลเป็นเวลา 2 เดือนก่อนทำการทดลอง

1.3 การปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพืชอาศัย

1.3.1 การปลูกเชื้อในกล่องพลาสติก ใช้ micropipette ดูดไส้เดือนฝอย *R. similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope จำนวน 20 ตัว/น้ำ 200 ไมโครลิตร/ต้น และหยดลงใกล้บริเวณรากพืช โดยในขณะปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย ให้ดินทรายภายในกล่องปลูกชุ่มน้ำเท่านั้น เพื่อให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหารากพืชได้เร็วกว่าการที่ต้นพืชแช่น้ำ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 12 ชม. จึงเติมน้ำเท่าระดับเดิม ดูแลต้นพืชตามปกติ

1.3.2 การปลูกเชื้อในบ่อซีเมนต์ ใช้ micropipette ดูดไส้เดือนฝอย *R. similis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Stereo microscope จำนวน 100±10 ตัว/น้ำ 1,000 ไมโครลิตร/ต้น และหยดลงใกล้บริเวณรากพืช โดยในขณะปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย ให้ดินทรายภายในบ่อปลูกชุ่มน้ำเท่านั้น เพื่อให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่เข้าหารากพืชได้เร็วกว่าการที่ต้นพืชแช่น้ำ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 12 ชม. จึงเติมน้ำเท่าระดับเดิม ดูแลต้นพืชตามปกติ

1.4. การตรวจไส้เดือนฝอยในรากพืชโดยวิธีย้อมสีราก

นำรากพืชที่ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยแล้วเป็นเวลา 25 วัน มาย้อมสีเพื่อตรวจดูการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยภายในรากพืช โดยนำรากพืชมาล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นใช้กรรไกรตัดรากให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในบีกเกอร์และเติมสีย้อม acid fuchsin ใน lactophenol (1 % acid fuchsin 5 มล. + lactophenol 100 มล.) ให้ท่วมราก นำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 80 °ซ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำรากพืชขึ้นจากสารละลาย แล้วล้างผ่านน้ำไหลเพื่อล้างสีส่วนเกินออก และดูดซับน้ำออกด้วยกระดาษทิชชู นำชิ้นรากที่ติดสีใส่ใน Petri dish และเท lactophenol ให้ท่วมชิ้นส่วนของราก ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชม. เพื่อให้ lactophenol กัดสีย้อมที่ติดรากออก สีย้อมทำปฏิกิริยากับตัวไส้เดือนฝอยหรือไข่ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโปรตีน จะติดสีแดงของ acid fuchsin ส่วนเนื้อเยื่อรากไม่ติดสี (นุชนารถ, 2549) นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1.5. การตรวจแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากพืชโดยใช้คลื่นเสียง

ทำการตรวจรากพืชทุก 7 วัน โดยนำรากพืชแต่ละต้นที่ปลูกในบ่อซีเมนต์ ล้างผ่านน้ำไหล จากนั้นนำไปใส่ในภาชนะแก้วใสหรือบีกเกอร์ เติมน้ำท่วมราก นำไปวางในเครื่อง Ultrasonic ที่มีน้ำระดับเท่ากับในบีกเกอร์ เปิดคลื่นเสียงเป็นเวลา 20 นาที ได้ไส้เดือนฝอยในน้ำเทผ่านผ้ากรองละเอียดเพื่อได้ไส้เดือนฝอยในน้ำใส

1.6. บันทึกผล

6.1 ตรวจไข่ไส้เดือนฝอยภายในรากย้อมสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6.2 ตรวจระยะการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ทุก 7 วัน จนครบวงจรชีวิต

เวลาและสถานที่

เวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2550 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนปลูกพืชทดลองกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในรากไม้น้ำ

1.1 การศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาวงจรชีวิตและความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *Radopholus similis* ในพืชอาศัย โดยทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นแครอท สภาพปลอดเชื้อ เป็นเวลา 2 เดือน (ตรวจผลครั้งที่ 1) พบว่า ไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ให้ลูกประมาณ 2 ชั่วอายุ นับจำนวนเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ (350 370 420 480 220 180 260 410 330 และ 190/จานเพาะเลี้ยง) เท่ากับ 321 ตัว/จานเพาะเลี้ยง โดยมีค่าต่ำสุดที่ 180 ตัว/จานเพาะเลี้ยง และสูงที่สุดเท่ากับ 480 ตัว/จานเพาะเลี้ยง เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากชิ้นแครอท ไปปลูกเชื้อในรากไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ที่ปลูกในทรายหยาบ จำนวน 20 ตัว/ต้น เป็นเวลา 25 วัน พบตัวเต็มวัยเพศเมียของ *R. similis* เริ่มวางไข่ภายในราก โดยพบไข่ของไส้เดือนฝอยติดสีแดงของสีย้อม acid fuchsin

ผลการทดลองดังกล่าว เป็นรายงานข้อมูลการตรวจผลครั้งที่ 1 เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *R. similis* ในชิ้นส่วนของพืชหรือในชิ้นแครอทนั้น ได้ดัดแปลงวิธีการเพาะเลี้ยงของ INIBAP (1997) ซึ่งยังมีความยุ่งยากในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงและการเตรียมสารฆ่าเชื้อ ให้ปฏิบัติได้ง่าย รวดเร็วขึ้น และมีต้นทุนต่ำ ตลอดจนยังดัดแปลงวิธีการวางชิ้นแครอทบนอาหารวุ้น 1.5 % เพื่อเพิ่มความชื้นและพื้นที่เคลื่อนตัวให้กับไส้เดือนฝอยในขณะบ่มเพาะอีกด้วย นอกจากนั้นวิธีการปลูกพรรณไม้น้ำในกระบะทรายและการดูแลให้พืชน้ำรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ ต้องใช้เวลาในการศึกษาเพื่อได้ประสบการณ์และความชำนาญในการปลูก อย่างไรก็ตาม ผลของงานวิจัยในครั้งนี้เป็นงานแรกของประเทศไทยในการเพาะเลี้ยง *R. similis* ในชิ้นแครอทที่ประสบผลสำเร็จในระดับหนึ่ง ซึ่งในอนาคตจะสามารถพัฒนาวิธีการให้ก้าวหน้าต่อไป โดยการศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยา

ของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในพืชอาศัยทุกชนิด มีความจำเป็นต้องใช้ inoculum ในปริมาณที่เพียงพอต่อการทดลอง โดยเฉพาะงานวิจัยด้านชีวและนิเวศวิทยาของเชื้อสาเหตุ ความรู้และความเข้าใจชีววิทยาของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช จะสามารถตอบโจทย์งานวิจัยที่ครอบคลุมไปถึงการป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย *R. similis* ซึ่งเป็นศัตรูพืชที่มีความสำคัญต่อการส่งออกพืชน้ำ (aquatic plant) และไม้ประดับอื่นๆ ต่อไป

1.2 การศึกษาในระดับโรงเรือนปลูกพืช

เมื่อปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *R. similis* ในต้นไม้น้ำที่ปลูกในบ่อซีเมนต์จำนวน 100±10 ตัว/ต้น และทำการตรวจรากทุก 7 วันๆ ละ 5 ต้น โดยใช้เทคนิคการแยกไส้เดือนฝอยออกจากรากด้วยคลื่นเสียง พบไส้เดือนฝอยเข้าสู่ระบบรากพืชทดสอบที่ 7 วันหลังปลูกเชื้อ และพบไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตในราก โดยพบเพศเมียและเพศผู้จำนวน 22 และ 8 ตัว ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ในวันที่ 21 และ 28 วัน พบไข่ของไส้เดือนฝอยอยู่ภายในรากพืช และเริ่มพบตัวอ่อนระยะที่ 2 และ 3 รวมวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *R. similis* ในไม้น้ำเท่ากับ 28 วัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไส้เดือนฝอย *R. similis* สามารถเจริญเติบโตในชิ้นแครอทตามวิธีการเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงจาก INIBAP (1997) โดยเลี้ยงไส้เดือนฝอยเริ่มต้นจำนวน 50 ตัว เพิ่มเป็น 321 ตัว/จานเพาะเลี้ยง หรือเพิ่มขึ้น 6.42 เท่า ภายในเวลา 2 เดือน และเมื่อนำมาปลูกเชื้อในพืชอาศัย (ไม้น้ำสกุล *Anubias* sp.) ในระดับห้องปฏิบัติการ พบตัวเมียเต็มวัยและไข่ภายในรากพืชที่เวลา 25 วันหลังใส่ไส้เดือนฝอย

เมื่อทำการปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยจำนวน 100 ±10 ตัว/ต้น ในไม้น้ำสกุล *Anubias* sp. ที่ปลูกในบ่อซีเมนต์ โดยทำการตรวจแยกโดยใช้คลื่นเสียง ทุก 7 วัน พบว่าไส้เดือนฝอยเริ่มเคลื่อนที่เข้ารากพืช และเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้เพศเมียในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบระยะไข่และตัวอ่อน รวมวงจรชีวิตเท่ากับ 28 วัน

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2549. ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 42 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2551. Burrowing Nematode ศัตรูพืชกักกันของไม้น้ำส่งออก. ข่าวอารักขาพืช 3(3) : 3.

Duncan, L. W., and E. Cohn. 1990. Nematode parasites of citrus. Pp. 321-346 in M. Luc, R.A. Sikora, and J. Bridge, eds. Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CAB International, Wallingford, U.K.

Evans, K., D.L. Trudgill, and J.M. Webster. 1993. Chapter 1. Extraction, Identification and Control of Plant Parasitic Nematodes. in Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture. CAB International, UK. 648 pages.

Fogain, R. 2000. Effect of *Radopholus similis* on plant growth and yield of plantains (*Musa*, AAB). Nematology 32 : 129-133.

Sipes, B.S., D.P. Schmitt, and S.C. Nelson. 2001. Burrowing nematode, a major pest in the tropics. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-21.

INIBAP. 1997. INIBAP Technical Guidelines. 1. Screening of *Musa* Germplasm for resistance and tolerance to nematodes. Speijer, P.R. and De Waele, D. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. 47 p.

Timm. R.W. 1965. A preliminary survey of plant parasitic nematodes of Thailand and the Philippines. Thai Sambhand Printing Press. Bangkok. 71 p.

Uchida, J.Y., B.S. Sipes, and C.Y. Kadooka. 2003. Burrowing nematode on anthurium: Recognizing symptoms, understanding the pathogen, and preventing disease. University of Hawaii, CTAHR Plant Disease Publication PD-24.

การเฝ้าระวังโรคไวรัสของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ OFV, TRSV และ Potyvirus

Surveillance for Virus Diseases of Orchid cause by OFV TRSV and Potyvirus

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/] สรุภี กีรติยะอังกูร[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การตรวจตัวอย่างกล้วยไม้นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์, ญี่ปุ่น,ไต้หวันของบริษัทไพรทูรย์สะพลี และตัวอย่างของบริษัทเทพวงศ์ออคิดส์ และแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ของ จ.เชียงใหม่และจ. ลำพูน นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจสอบเชื้อไวรัส OFV, TRSV เพื่อหาอนุภาคเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น ยังไม่พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus และเชื้อไวรัส OFV, TRSV ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรและบริษัทนำเข้ากล้วยไม้ของไทย และการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ในแปลงปลูกในปีสุดท้ายนั้นเพื่อทำการตรวจสอบหาเชื้อในกลุ่ม Potyvirus และเชื้อไวรัส OFV, TRSV ยังอยู่ในระหว่างการดำเนินงาน เพื่อรวบรวมและสรุปผลต่อไป

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-01-01-09-51

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ สำหรับประเทศที่นำเข้าต้นกล้วยไม้จากไทยส่วนใหญ่นำไปประดับ มีส่วนน้อยที่นำไปเป็นต้นพันธุ์ แต่การนำเข้าของผู้ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยจะนำพันธุ์ที่แปลกใหม่มาเป็นต้นพันธุ์ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การนำต้นที่ติดเชื้อไวรัสเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทยย่อมมีผลกระทบโดยตรงต่อการเพิ่มและแพร่ กระจายโรคไวรัสที่ติดมากับต้นพันธุ์ ส่วนที่นำต้นพันธุ์เข้ามาเพื่อผสมพันธุ์แม้เชื้อจะไม่ถ่ายทอดทางเมล็ดแต่ เป็นการนำต้นกล้วยไม้ที่มีเชื้อไวรัสมาปะปนอยู่ในแหล่งปลูก หลายประเทศมีข้อกำหนดให้มีใบรับรองการปลอดเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นอกเหนือจาก CyMV และ ORSV เช่นต้องการให้รับรองต้นกล้วยไม้ปลอดจาก เชื้อ Orchid fleck virus (OFV), Tomato ring spot virus (TRSV) และ Potyvirus ซึ่งมีการระบาดอยู่ในหลายประเทศ ได้แก่ Australia Germany Japan New Zealand ไต้หวัน เกาหลี เป็นต้น Franki (1985) พบว่าเชื้อไวรัสที่ทำให้ กล้วยไม้พันธุ์ Dendrobium spp มีอาการด่างคือเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus เป็น Dendrobium mosaic virus (DeMV) (Synonym of clover yellow vein virus) มีการรายงาน coat protein gene ขนาด 1,143bp ส่วน OFV ทำให้กล้วยไม้มีอาการขีดประดำบนใบ (Chang *et.al.* 1991, Chang, *et.al.* 2007)

มีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus ในกล้วยไม้อยู่หลายชนิดได้แก่ Bean yellow mosaic virus, Clover yellow vein virus, Dendrobium mosaic potyvirus, Filamentous Orchid virus, Spiranthes mosaic virus, Turnip mosaic virus (Zettler *et al*., 1990) แล้วยังพบว่าพืชในตระกูล Orchidaceae หลายชนิดมีเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus เข้าทำลายได้ ได้แก่ Vanilla พบเชื้อ Vanilla mosaic potyvirus, Pecteillis mosaic potyvirus และ Habenaria พบเชื้อ Habenaria mosaic potyvirus รวมทั้ง Dendrobium พบเชื้อ Dendrobium mosaic potyvirus เข้าทำลายเป็นต้น และเชื้อไวรัสเหล่านี้สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงเพลี้ยอ่อน ดังนั้นนอกเหนือจากเชื้อ CyMV และ ORSV แล้วยังมีเชื้อ OFV, TRSV, และไวรัสในกลุ่มของ Potyvirus หลายชนิดดังกล่าวที่ถูกตรวจพบบนกล้วยไม้ สุรภี(2547) รายงานพบเชื้อไวรัสชนิดท่อนยาวคดมีขนาดของอนุภาค ประมาณ 750 นาโนเมตรทำให้เกิดอาการปื้นดำบนกล้วยไม้หลายพันธุ์ซึ่งสามารถตรวจจำแนกได้ด้วยสายตาและพบจำนวนน้อยเพียง 2-3 แห่งได้แนะนำให้กำจัดและหลีกเลี่ยงนำมาทำพันธุ์

Mackenzie (1998) ตรวจพบ Potyvirus ในกล้วยไม้ 33 ชนิด ด้วยวิธี RT-PCR ด้วยชุด primers ที่เฉพาะเจาะจงกับกลุ่ม Potyvirus ในส่วนของ SP6 หรือ T7 ลำดับเบสของ genome ของ

ไวรัสที่แยกมาจากกล้วยไม้เป็นโรค 5 ตัวอย่างโดยส่วนใหญ่ มีความสัมพันธุ์ใกล้กับ bean common mosaic group

Chang(1991) ได้สำรวจโรคไวรัสในกล้วยไม้ในประเทศเกาหลี จำนวน 640 ชนิด ใน 13 genera พบไวรัสหลายชนิดได้แก่ Orchid fleck virus (OFV), Cymbidium mosaic virus (CyMV), Odontoglossum ringspot virs (ORSV), Dendrobium mosaic virus (DMV) และ Potyvirus พบทั้งที่เข้าทำลายกล้วยไม้เป็นเชื้อเดี่ยวและเข้าทำลายทีละ 2-3 เชื้อ

Kendo(2003) รายงานว่า OFV สามารถถ่ายทอดได้ด้วยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นและไร (*Brevipalpus californicus* Bank) แบบ persistent ถ่ายทอดได้ทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อน และพบว่า OFV ประกอบด้วย RNA 2 ชนิดคือ RNA1 (6431 bp) และ RNA2 (6001 bp) จัดอยู่ในกลุ่ม Plant Rhabdoviruses ใน Rhabdoviridae family

Chang(2007) แยกเชื้อ OFV ออกมาได้จากกล้วยไม้พันธุ์ Cymbidium, Dendrobium, Odontoglossum, Oncidium , Angulorea และ Pescatorea เชื้อ OFV มีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ ยาสูบใบใหญ่ ยาสูบใบเล็ก *Chenopodium amaranticolor* และถ่ายทอดด้วยวิธีการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นพืช อนุภาคของ OFV เป็นแบบ bacilliform ที่มีขนาดประมาณ 40 X 150 nm

Singh(2007) แยกเชื้อ Potyvirus ได้จากกล้วยไม้ป่าพันธุ์ *Cymbidium pendulum* และ *C. tigrinum* ที่เมือง Sikkim ทางเหนือของอินเดีย ตรวจสอบด้วยวิธี ELISA, RT-PCR และ Northern blot analysis การใช้ primer ที่มีความเฉพาะของ Potyvirus group พบว่าไวรัสนี้มีความสัมพันธุ์ใกล้กับ Calanthe mild mosaic virus

ประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดทั้ง 3 ชนิดนี้บนกล้วยไม้ จึงควรทำการสำรวจและจำแนก เพื่อจัดทำข้อมูลในการทำรายชื่อศัตรูพืชและวิเคราะห์ความเสี่ยงในการกำหนดศัตรูพืชกักกันปัจจุบันผู้ปลูกกล้วยไม้ของไทยมีความสามารถในการผลิตต้นกล้วยไม้ปลอดโรคได้กว้างขวางมากขึ้นและมีความเข้าใจในการต้องคัดเลือกใช้เฉพาะต้นพันธุ์ปลอดเชื้อมาทำพันธุ์ และประโยชน์จากการสำรวจเชื้อทั้ง 3 ชนิด ทำให้ได้ข้อมูลของการเป็นโรคจากเชื้อ CyMV และ ORSV และความเสียหายของต้นกล้วยไม้ในแหล่งปลูกที่แท้จริง เพื่อกำหนดแนวทางในการควบคุมอัตราการเป็นโรคเชื้อ CyMV และ ORSV เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการให้การรับรองสวนเพื่อการส่งออกและยังใช้เป็นข้อมูลในการวางข้อกำหนดอัตราการติดเชื้อ CyMV และ ORSV ของกล้วยไม้นำเข้าต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra centrifuge
- ตู้แช่แข็ง -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และเตรียมแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการผิดปกติ มีอาการใบด่าง necrosis และอาการขีดไหม้ จากแปลงปลูกกล้วยไม้รวมทั้งตัวอย่างนำเข้าในพื้นที่ต่างๆ มาศึกษาลักษณะอาการ ทำการจดบันทึกรายละเอียดข้อมูลแหล่งพบ และชนิด พันธุ์

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจหาเชื้อไวรัส OFV, TRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) ในกลุ่ม Potyvirus

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN_3, 0.2% Na_2SO_3, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N+ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยด

ตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ Potyvirus ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ) รอดูผลของปฏิกิริยาประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

2.2 ตรวจหาเชื้อไวรัส OFV, TRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 ที่ผ่านการตรวจหาเชื้อในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี NCM-ELISA มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส OFV และ TRSV โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม 300 ช่องต่อตารางนิ้ว) มาคว่ำลงบนน้ำคั้นทิ้งไว้ 1 นาที ใช้คีมคีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริด หยดน้ำกลั่นลงบนกริดเพื่อชะล้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่นเกลือต่างๆออกไป ทำการย้อมสีแบบ negative staining ซึ่งเป็นการย้อมสีพื้นที่รอบๆอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย 2% Phosphotungstic acid (PTA) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้เพื่อใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส

ในปี 2552 ได้เก็บตัวอย่างกล้วยไม้นำเข้าจากเนเธอร์แลนด์, ญี่ปุ่น,ไต้หวันของบริษัทไพรทูรย์สะพลีและตัวอย่างของบริษัทเทพวงศ์ออคิดส์ รวมทั้งจากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรที่มีอาการผิดปกติ และในปี 2553 ได้เก็บตัวอย่างกล้วยไม้จากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ของ จ.เชียงใหม่ และ จ.ลำพูน รวมทั้งเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ของทางบริษัทไพรทูรย์สะพลี ซึ่งเป็นกล้วยไม้นำเข้าจากไต้หวัน (ระหว่างเดือนตุลาคม 2552 – มีนาคม 2553) นำมาตรวจหาเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจากการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการผิดปกติ มีอาการใบด่าง necrosis และอาการขีดไหม้ ที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อ CyMV และ ORSV ต้องทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดูอนุภาคของเชื้อไวรัสว่าเป็นชนิดท่อนยาวคด หรือแบบ bacilliform

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจหาเชื้อไวรัส OFV, TRSV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้เพื่อหาเชื้อไวรัสทั้งในกลุ่ม Potyvirus ด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) และตรวจสอบเชื้อไวรัส OFV, TRSV เพื่อหาอนุภาคเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้น ยังไม่พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus และเชื้อไวรัส OFV, TRSV ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรและบริษัทนำเข้ากล้วยไม้ของไทย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้ดังกล่าว ที่ได้เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกตามแหล่งต่างๆ มาทำการตรวจสอบนั้นจึงสรุปได้ว่ายังไม่พบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้ระบาดในประเทศไทยและยังไม่พบเชื้อไวรัส OFV, TRSV ในแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรและบริษัทนำเข้ากล้วยไม้ของไทยอีกด้วย ซึ่งการตรวจสอบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้นั้น มีการใช้ MAb ของ Potyvirus ทั้งของ สวทช. และ AGDIA ในการตรวจจำแนกเชื้อ Potyvirus และยังใช้ MAb ตรวจหาเชื้อ PhCSV ในกล้วยไม้นำเข้าของไต้หวันอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2534. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบเชื้อ TMV-O ของกล้วยไม้พันธุ์หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2534. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-8.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 115-122.

Chang, M.U., H.H. Chun, D.H. Baek and J.D. Chung. 1991. Study on the Viruses in Orchids in Korea : Dendrobium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Orchid fleck virus, and unidentified potyvirus. The Plant Pathology Jurnal. Vol. 6 :118-129.

Chang,M.U., A.Kei, D.Yoji and Y. Koyoshi. 2007. Morphology and Intracellular Appearance of Orchid fleck virus. The Phytopathological Society of Japan Vol 42 (2) :156-167.

Kendo,H., T. Maeda and T. Tamada. 2003. Orchid fleck virus: Brevipalpus californicus Mite Transmission, Biological properties and genome structure. Experimental and Applied Acarology Vol. 30(1-3) : 215-223.

Mackenzie,A.M., M.Nolan, K.J.Wel, M.A. Clements, D.Gowanlock, B.J.Wallace and A.J.Gibbs. 1998 . Ceratobium mosaic Potyvirus : another virus from orchids. Archives of Virology. Vol 143 (5) 903-914.

Singh,M.K.,A.R.Sherpa,V.Hallan and A.A.Zaidi. 2007. A Potyvirus in Cymbidium spp.in northern India. Australasian Plant Disease Notes 2(1) 11-13.

Zettler,F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliottanc and S.M. Wong. 1990. Viruses of Orchids and Thair Control. Plant Disease, Vol. 74(9) 621-626.

การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง, *Sternochetus mangiferae* ในมะม่วง

Distribution of Mango Seed Weevil, *Sternochetus mangiferae* On Mango

สราญจิต ไกรฤกษ์ บุษบง มนัสมั่นคง สัญญาณี ศรีคชา
ยุทธนา แสงโชติ ศรุต สุทธิอารมณ์ สุนัดดา เชาวลิต
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง ในปี พ.ศ. 2552 จากพื้นที่การปลูกมะม่วงที่ปลูกเพื่อการส่งออกใน จ.เชียงใหม่ เชียงราย และ ลำพูน รวม 15 สวน ผ่าเมล็ดมะม่วงแก้วและมะม่วงโชคอนันต์ ประมาณ 4,736 เมล็ด เพื่อตรวจนับปริมาณด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง พบด้วงตัวเต็มวัย 40 ตัว ดักแด้ 3 ตัว หนอน 12 ตัว และจำแนกชนิดแล้วคือ *Sternochetus olivieri* (Faust) Family Curculionidae ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บผลมะม่วงพันธุ์งามเมืองย่าที่ อ.ปักธงชัย จ. นครราชสีมา จำนวน 2 สวน ผ่าเมล็ดมะม่วง ประมาณ 12,742 เมล็ด พบด้วงตัวเต็มวัย 548 ตัว ดักแด้ 15 ตัว หนอน 18 ตัว ด้วงงวงที่จำแนกชนิดได้แล้วคือ *Sternochetus olivieri* เช่นกัน

คำนำ

การส่งมะม่วงไปต่างประเทศนั้น นอกจากจะต้องปรับปรุงคุณภาพเพื่อให้ตรงตามความต้องการของประเทศคู่ค้าแล้ว ปัญหาหนึ่งที่รัฐกำลังดำเนินการแก้ไขในปัจจุบันคือ ปัญหาของศัตรูพืชที่อาจติดไปกับผลผลิตได้ แต่ละประเทศจะมีมาตรการการนำเข้าด้านกักกันพืชแตกต่างกันไป ดังเช่น ตลาดมาเลเซีย สิงคโปร์ และฮ่องกงไม่เข้มงวดเท่าตลาดประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย ซึ่งมีขั้นตอนการนำเข้าสินค้าพืชจากต่างประเทศที่เคร่งคัดมาก มะม่วงของไทยที่จะส่งไปจำหน่ายในบางประเทศจะต้องผ่านขั้นตอนและกรรมวิธีควบคุมศัตรูพืชอย่างใกล้ชิด ทั้งนี้เพื่อป้องกันการระบาดของแมลงศัตรูมะม่วงที่ติดไป จากประเทศไทย โดยเฉพาะด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง ที่พบระบาดในประเทศนั้น เป็นชนิดที่ไม่เคยพบมาก่อนในประเทศนั้น นับเป็นปัญหาสำคัญต่อการส่งมะม่วงไปต่างประเทศ ดังที่เคยเกิดขึ้นในประเทศอินเดียที่มีการระบาดของ ด้วงงวงเจาะเมล็ด ชนิด *Sternochetus mangiferae* (Fabricius) ทำความเสียหายแก่มะม่วงในอินเดียสูงจนเป็นสาเหตุให้ สหรัฐอเมริกา ซึ่งเคยสั่งซื้อมะม่วงจากอินเดีย งดการสั่งมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 เพราะ

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-02-01-01-51

เกรงว่าด้วงงวงชนิดนี้จะติดไประบาดในสหรัฐอเมริกาได้

ด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง (mango seed weevil, mango pulp weevil, mango fruit weevil, mango flesh weevil, mango nut weevil) อยู่ในวงศ์ Curculionidae อันดับ Coleoptera เป็นแมลงศัตรูที่ทำลายและอาศัยในเมล็ด ชนิดที่พบมากในแหล่งปลูกมะม่วงในประเทศแอฟริกา ออสเตรเลีย อินเดีย ประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประเทศในหมู่เกาะแปซิฟิก รวมทั้งฮาวาย และประเทศแถบอินเดียตะวันตกเป็นชนิด *Sternochetus mangifera* (Fabricius) รายงานที่พบในประเทศแอฟริกา อินเดีย อิหร่าน บังคลาเทศ ศรีลังกา และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ พม่า ไทย เวียดนาม มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์ เป็นชนิด *S. frigidus* (Fabricius) **การสำรวจในประเทศไทย ที่พบส่วนใหญ่เป็นชนิด *Sternochetus olivieri* (Faust) แต่ชนิด *S. frigidus* (Fabricius) จะพบน้อยกว่า ส่วนชนิด *S. mangifera* (Fabricius) ยังไม่พบเลย** รูปร่างลักษณะของ *S. olivieri* (Faust) มีขนาดใหญ่กว่า *S. frigidus* (Fabricius) เล็กน้อย ปีกแข็งสีน้ำตาลเข้มเป็นรูปสามเหลี่ยม โดยฐานอยู่ที่โคนปีกมุมแหลมอยู่ด้านล่างยาวประมาณ 1/3 ของความยาวปีก ถัดมาเป็นสีน้ำตาลอ่อนเป็นแถบใหญ่ชัดเจนส่วนที่เหลือตรงปลายปีกสีน้ำตาล ขนาดยาว 7.0 - 8.0 มิลลิเมตร กว้าง 4.0 - 4.5 มิลลิเมตร อีกชนิดหนึ่งคือ *S. frigidus* (Fabricius) เป็นด้วงงวงที่มีงวงยาว รูปร่างกลมรี สีน้ำตาล ผิวขรุขระ ปีกแข็งมีแถบสีน้ำตาลอ่อนเป็นรูปตัว V เริ่มจากริมขอบบนปีกแข็ง เป็นทางลงถึงกลางปีกแต่ยาวไม่ถึงขอบกลางปีก ขนาดยาว 6.0 - 6.5 มิลลิเมตร กว้าง 2.5-3.0 มิลลิเมตร (สมหมาย, 2535)

ด้วงงวงชนิดนี้เคยพบการทำลายในมะม่วงที่ปลูกทางภาคเหนือของประเทศไทยจากที่มีตัวอย่างรวบรวมในพิพิธภัณฑ์แมลง เป็นด้วงงวงเจาะเมล็ดที่พบเป็นครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2482 ที่จ.เชียงใหม่ และพบอย่างต่อเนื่องแต่มีปริมาณไม่มากนัก ต่อมาจึงเริ่มมีการสำรวจโดย Cunningham (1990) รายงานในแหล่งการปลูกมะม่วง ที่จ.ราชบุรี โดยการเก็บตัวอย่างผลมะม่วงทั้งหมด 1,043 ตัวอย่าง พบด้วงงวงเพียง 9 ตัวอย่าง และเป็นชนิด *Sternochetus olivieri* (Faust) ซึ่งไม่เคยสำรวจพบในประเทศออสเตรเลีย

ต่อมาในปี พ.ศ. 2536 สุชาดา และคณะ(2539) ได้สำรวจที่จ.ราชบุรีในมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ อกร่อง ตลับนาค หนองแซง เขียวเสวย พราหมณ์ขายเมีย น้ำดอกไม้ แตงกวา แก้มแดง แรด หนังกลางวัน พิมเสน ทองดำ และพันธุ์แก้ว รวมทั้งหมดประมาณ 200 กิโลกรัม ไม่พบการทำลายของด้วงงวงเจาะเมล็ดเลย และสำรวจที่จ.ฉะเชิงเทราในมะม่วงพันธุ์หนังกลางวัน จำนวน 550 กิโลกรัม ไม่พบการทำลายเช่นเดียวกัน ในปี พ.ศ. 2537 เดือนมิถุนายน สำรวจที่อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ ในมะม่วงแก้ว หนังกลางวัน ตลับนาค น้ำดอกไม้ หนองแซง และพันธุ์งา พบการทำลาย 15.54 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2538 สำรวจ 2 ครั้ง ที่อ.แม่อาย จ.เชียงใหม่ เดือนมิถุนายน และเดือนกรกฎาคม ในมะม่วงป้อม และมะม่วงแก้ว พบการทำลาย 10.19 และ 37.36 เปอร์เซ็นต์ และได้ให้

ข้อสังเกตว่ามะม่วงที่ปลูกเพื่อการค้าไม่พบการทำลายของด้วงงวงเจาะเมล็ดเลย แต่จะพบการทำลายในสภาพการปลูกหลังบ้านและมักพบที่ต้นมะม่วงอายุมากกว่า 20 ปี ขึ้นไป

การสำรวจของ สราญจิตและคณะ (2545) ในปี พ.ศ. 2541 – 2542 จากสวนมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ที่ปลูกเพื่อการส่งออกใน จ.ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ปราจีนบุรี และสระแก้ว พบการทำลายของด้วงงวง 0.50 เปอร์เซ็นต์ จากผลมะม่วงอายุประมาณ 60 วัน และไม่พบหรือดักแด้หรือตัวเต็มวัยภายในเมล็ด ปี พ.ศ. 2543 - 2544 ได้สำรวจจากมะม่วงที่ปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศจากสวนที่ไม่ได้มีการใช้สารฆ่าแมลงมากนักใน จ.นครราชสีมา ศรีสะเกษ เพชรบูรณ์ ชัยภูมิ พบการเข้าทำลาย 8.38 - 65.71 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2545 สำรวจจากมะม่วงแก้วที่ปลูกเพื่อการบริโภคในท้องถิ่นและไม่มีการใช้สารฆ่าแมลงใน จ.ศรีสะเกษ พบการเข้าทำลาย 18.19 เปอร์เซ็นต์ จ.ชัยภูมิ พบ 22.39 เปอร์เซ็นต์ จ.เพชรบูรณ์ 26.14 เปอร์เซ็นต์ และสำรวจจากเมล็ดมะม่วงจากโรงงานแปรรูปผลไม้ที่จ.เพชรบุรี ซึ่งรับซื้อมะม่วงแก้วจากทั่วประเทศ พบการทำลาย 22.23 เปอร์เซ็นต์ ด้วงงวงทั้งหมดที่เก็บตัวอย่างได้นี้นำไปจำแนกชนิดได้ว่าเป็นชนิด *Sternochetus olivieri* (Faust) จัดอยู่ใน Family Curculionidae

ปัจจุบันประเทศที่เป็นสมาชิกขององค์การการค้าโลก (WTO) ได้นำมาตรการสุขอนามัยพืชมาใช้เป็นข้อต่อรองในการส่งออกและนำเข้าสินค้าที่เป็นผลิตผลเกษตร การสำรวจติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชจึงเป็นพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการดำเนินการด้านอื่นๆ อีก เช่น Pest Risk Analysis, Establishment for pest free area, Pest list, Pest report เป็นต้น ดังเช่นการส่งออกมะม่วง ในประเทศไทยพบด้วงงวงเจาะเมล็ด 2 ชนิด คือ *Sternochetus olivieri* (Faust) และ *S. frigidus* (Fabricius) แต่ยังไม่พบชนิด *S. mangiferae* (Fabricius) ซึ่งเป็นชนิดที่ประเทศปลายทางไม่เคยพบมาก่อนและประกาศให้เป็นแมลงด้านกักกันพืช จึงได้ดำเนินการสำรวจเพื่อตรวจหา (Detection survey) (McMaugh, 2005) เพื่อทราบชนิดและสถานการณ์การแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงชนิด *S. mangiferae* (Fabricius) ในมะม่วงเพื่อการส่งออก เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช (pest list) และใช้เป็นข้อมูลการออกประกาศการปลอดศัตรูพืชเพื่อสนับสนุนการขอเปิดตลาดสินค้าเกษตรระหว่างประเทศต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สวนมะม่วง
2. กล่องเลี้ยงแมลง ขนาด 20x15x10 เซนติเมตร และขนาด 10x10x15 เซนติเมตร
3. ขวดแก้วสำหรับเก็บรักษาแมลง

4. แอลกอฮอล์ 80%
5. เข็มไร้สนิม
6. กล้องจุลทรรศน์ กล้องถ่ายภาพ
7. แว่นขยาย ขนาด 10 เท่า
8. กระบอกตวง(cylinder) beaker หลอดแก้ว พู่กัน สำลี เป็นต้น
9. คู่มือการจำแนกชนิดแมลง
10. เครื่องวัดพิกัด อุปกรณ์การบันทึกข้อมูล สมุดบันทึก แผ่นบันทึกข้อมูล ปากกา ยางลบ

วิธีการ

ขั้นตอนการทำงานวิจัย มีดังนี้

1. พื้นที่ : ดำเนินการสุ่มสำรวจในแหล่งปลูกเพื่อการส่งออกภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะที่จ.เชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้แก่จ. นครราชสีมา โดยสุ่มในสวนมะม่วงในแต่ละแหล่งตามสัดส่วนพื้นที่ปลูก โดยวิธีการสุ่มอย่างง่าย (random sampling)
2. ช่วงเวลาการสำรวจ : ช่วงการเก็บเกี่ยวผลผลิต 1 เดือน โดยสุ่มสำรวจ 2 ครั้ง
3. ขนาดตัวอย่าง : สุ่มเก็บผลมะม่วงจากต้นมะม่วง 20 ต้น/สวนโดยวิธีสุ่มอย่างง่าย (random sampling) ต้นละ 10 ผล รอบทรงพุ่ม
4. นำผลมะม่วงที่สุ่มมาผ่าดูภายในผลเพื่อเก็บตัวอย่างด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง

เก็บผลมะม่วงจากแหล่งที่ปลูกเพื่อการส่งออกและเพื่อการบริโภคภายในประเทศ เลือกพันธุ์หลักที่เป็นพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการส่งออก ได้แก่ พันธุ์แรด น้ำดอกไม้ หนังกลางวัน มหาชนก และพิมเสน และเก็บจากสวนมะม่วงพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการอุตสาหกรรมแปรรูป ได้แก่ มะม่วงแก้ว โชคอนันต์ เป็นต้น เก็บตัวอย่างแมลงทุกระยะที่พบ ถ้าเป็นระยะไข่ หนอน และดักแด้ เก็บรักษาในขวดดองแมลง สำหรับตัวเต็มวัยจัดรูปร่างโดยใช้เข็มไร้สนิม จัดเตรียมเพื่อนำไปอบให้แห้ง และบันทึกจำนวนผลมะม่วงที่ถูกทำลายในแต่ละสวน นำด้วงงวงที่พบไปจำแนกชนิดที่กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2550 สิ้นสุด กันยายน 2553 รวม 3 ปี

ณ แหล่งปลูกมะม่วงภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน

แหล่งปลูกมะม่วงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จ.นครราชสีมา

ผลและวิจารณ์

การสำรวจชนิดของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง (ตารางที่ 1) ในสวนมะม่วง จ.เชียงใหม่ อ.พร้าว 6 สวน จำนวน 1,256 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 15 ตัว และหนอน 8 ตัว และ อ.เชียงดาว 5 สวน จำนวน 1,822 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 11 ตัว ดักแด้ 2 ตัว และหนอน 2 ตัว จ.เชียงราย 3 สวน อ.เมือง จำนวน 405 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 1 ตัว และ จ.ลำพูน อ.บ้านโฮ่ง 1 สวน จำนวน 1,253 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 13 ตัว ดักแด้ 1 ตัว และหนอน 8 ตัว รวมจำนวนเมล็ดมะม่วงทั้งสิ้น 4,736 เมล็ด จากสวนมะม่วง 15 สวน เป็นมะม่วงแก้วและมะม่วงโชคอนันต์ พบด้วงตัวเต็มวัย 40 ตัว ดักแด้ 3 ตัว หนอน 12 ตัว และจำแนกชนิดแล้วคือ *Sternochetus olivieri* (Faust) Family Curculionidae สวนมะม่วงที่สำรวจนี้มีการปฏิบัติดูแลและการป้องกันกำจัดศัตรูพืชปานกลาง ใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเมื่อพบการระบาดของแมลงศัตรูมะม่วง 1-2 ครั้ง ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตารางที่ 1) เก็บผลมะม่วงพันธุ์งามเมืองย่าที่ อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา จำนวน 2 สวน เป็นสวนมะม่วงอินทรีย์ที่จำหน่ายในประเทศและยังส่งออกตลาดต่างประเทศ ผ่าเมล็ดมะม่วง ประมาณ 12,742 เมล็ด พบด้วงตัวเต็มวัย 548 ตัว ดักแด้ 15 ตัว หนอน 18 ตัว นำมาจำแนกชนิดแล้ว เป็นด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงชนิด *Sternochetus olivieri* (Faust) Family Curculionidae Order Coleoptera เช่นกัน

จากการสำรวจเพื่อเฝ้าระวังด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงในปี 2551(ตารางที่ 2) มะม่วงที่สำรวจทางภาคใต้ตอนบนและภาคตะวันตกส่วนใหญ่จะมีการจัดการดูแลอย่างดี ได้แก่มะม่วงน้ำดอกไม้ อกร่อง โชคอนันต์ มันเดือนเก้า มะม่วงแก้ว แก้วลืมรัง ฟ้าลั่น เขียวเสวย เป็นต้น จากการผ่าเมล็ดมะม่วงใน จ.ประจวบคีรีขันธ์ อ.หัวหิน (1 สวน) อ.สามร้อยยอด (35 สวน) อ.ปราณบุรี (3 สวน) อ.กุยบุรี (3 สวน) รวม 42 สวน และ จ.ราชบุรี อ.วัดเพลง (4 สวน) อ.ปากท่อ (2 สวน) รวม 6 สวน จำนวนทั้งหมด 11,899 เมล็ด พบด้วง 15 ตัว ในภาคเหนือ (ตารางที่ 3) เป็นมะม่วงพันธุ์เขียวมรกตที่ จ.ลำพูน อ.บ้านโฮ่ง (2 สวน) พบด้วง 1 ตัว ส่วนที่ จ.เชียงใหม่ อ.พร้าว (1 สวน) อ.เชียงดาว (1 สวน) อ.แม่แตง (1 สวน) รวม 3 สวน เป็นมะม่วงแก้วและเขียวมรกตที่ปลูกตามเชิงเขา มีการจัดการดูแลไม่มากนัก จำนวน 2,318 เมล็ด พบด้วง 152 ตัว ด้วงที่พบทั้งหมดนี้เป็นชนิด *S. olivieri* (Faust) Family Curculionidae ซึ่ง Cunningham (1990) ได้สำรวจใน จ.ราชบุรี และ สราญจิต และคณะ (2545) สำรวจในแหล่งปลูกภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าเป็นชนิด *S. olivieri* (Faust) เช่นเดียวกัน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจชนิดของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง ที่ได้จากการผ่าผลและเมล็ดมะม่วง ชนิดของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงในสวนมะม่วง จ.เชียงใหม่ อ.พร้าว จำนวน 1,256 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 15 ตัว และหนอน 8 ตัว และ อ.เชียงดาว จำนวน 1,822 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 11 ตัว ดักแด้ 2 ตัว และหนอน 2 ตัว สวนมะม่วง จ.เชียงราย อ.เมือง จำนวน 405 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 1 ตัว และ สวนมะม่วง จ.ลำพูน อ.บ้าน-โฮ่ง จำนวน 1,253 เมล็ด พบตัวเต็มวัย 13 ตัว ดักแด้ 1 ตัว และ หนอน 8 ตัว รวมจำนวนเมล็ดมะม่วงทั้งสิ้น 4,736 เมล็ด จากสวนมะม่วงทั้งหมด 15 สวน ซึ่งเป็น มะม่วงแก้วและมะม่วงโชคอนันต์ พบด้วงตัวเต็มวัย 40 ตัว ดักแด้ 3 ตัว หนอน 12 ตัว เป็นที่สังเกต ว่าสวนมะม่วงที่มีการดูแลสวนเป็นอย่างดี และมีวิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นๆ อยู่เป็นปกติ แล้ว มักพบการเข้าทำลายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงไม่มากนัก ด้วงทั้งหมดที่นำมาจำแนกชนิด พบว่าเป็นด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงชนิด *Sternochetus olivieri* (Faust) Family Curculionidae อยู่ใน Order Coleoptera

การสำรวจศัตรูพืชเพื่อสำรวจตรวจหาและการติดตามสถานการณ์การแพร่กระจาย ด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงชนิด *S. mangiferae* (Fabricius) ในมะม่วงเพื่อการส่งออกนี้ ยังต้อง ดำเนินการต่ออีกในปี 2553 เพื่อให้ครอบคลุมทุกพื้นที่การปลูกมะม่วงโดยเฉพาะสวนที่การปลูก มะม่วงเพื่อการส่งออก อันจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญต่อบทบาทการค้าระหว่างประเทศต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ เจ้าของสวนมะม่วงทุกๆ สวน ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน และ จังหวัดนครราชสีมา ที่ยินดีและอำนวยความสะดวกต่อการเก็บตัวอย่าง ตลอดจนเจ้าหน้าที่จาก ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ที่ช่วยเหลือในการติดต่อเจ้าของ สวนมะม่วงภาคเหนือ

เอกสารอ้างอิง

สมหมาย ชื่นราม. 2535. ด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง. วารสารกีฏและสัตววิทยา. 14 (1) : 53 – 59.

สุชาดา เสกสรรค์วิริยะ, วนิช ลิ่มโอภาสมณี, อรรจยา มาลากรอง และ พุฒิพงศ์ คชรินทร์. 2539. การสำรวจและการศึกษาผลของรังสีแกมมาต่อด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง. หน้า 95-103. ใน เอกสารการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ ครั้งที่ 6 วันที่ 2-4 ธันวาคม 2539 ณ โรงแรมเซ็นทรัล พลาซ่า กรุงเทพฯ.

สราญจิต ไกรฤกษ์ อรุณี วงษ์กอบรัษฎ์ และ สมหมาย ชื่นราม. 2545. ด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วงและการป้องกันกำจัด. ใน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 13 ประจำปี 2545 วันที่ 6-9 สิงหาคม 2545, ณ โรงแรมโกลเด้นแซนด์ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี. 263-276 หน้า.

สราญจิต ไกรฤกษ์ บุษบง มนัสมั่นคง สัญญาณี ศรีคชา ยุทธนา แสงโชติ ศรุต สุทธิอารมณ์ และ สุนัดดา เชาวลิต. 2551. การเฝ้าระวังการแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง, *Sternochetus mangiferae* ในมะม่วง. น. 55 ใน รายงานผลการค้นคว้าทดลอง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

Cunningham, I.C. 1990. Mango weevil survey, Ratchaburi Province, Thailand. 11 p.

McMaugh,T. 2005. Guidelines for surveillance for plant pests in Asia and Pacific. ACIAR Monograph No. 119, 192 p.

ตารางที่ 1 การเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง *Sternochetus* spp. ในมะม่วง

ข้อมูล พฤษภาคม-กรกฎาคม 2552

	พันธุ์	จำนวน(เมล็ด)	ด้วง(ตัว)	ดักแด้(ตัว)	หนอน(ตัว)	หมายเหตุ
1	แก้ว	1,651	25	3	12	
2	เขียวมรกต	3,085	15	0	0	
	รวม	**4,736**	**40**	**3**	**12**	

สำรวจจากสวนมะม่วง 15 สวน

จ. เชียงใหม่	อ.เชียงดาว	6 สวน
	อ.พร้าว	5 สวน
จ. เชียงราย	อ.เมือง	3 สวน
จ. ลำพูน	อ. บ้านโฮ่ง	1 สวน

ข้อมูล มิถุนายน-กรกฎาคม 2552

	พันธุ์	จำนวน(เมล็ด)	ด้วง (ตัว)	ดักแด้(ตัว)	หนอน(ตัว)	หมายเหตุ
1	งามเมืองย่า	12,742	548	15	18	
	รวม	**12,742**	**548**	**15**	**18**	

สำรวจจากสวนมะม่วง 2 สวน

อ.ปักธงชัย จ.นครราชสีมา

ตารางที่ 2 การสำรวจและเก็บผลมะม่วงในการเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง *Sternochetus* spp. ในแหล่งปลูกภาคตะวันตก (กุมภาพันธ์-มิถุนายน 2551)

	พันธุ์	จำนวนผล	ด้วง	ดักแด้	หนอน	หมายเหตุ
1	แก้ว	866	3		1	
2	แก้วโมง	85				
3	แก้วลืมรัง	886				
4	เขียวเสวย	239	2		2	
5	โชคอนันต์	1,141	1			
6	ทองดำ	193				
7	น้ำดอกไม้	4,771	4	1		
8	ฟ้าลั่น	477				
9	มหาชนก	198				
10	มันเดือนเก้า	1,018				
11	มันศาลายา	2				
12	หนังกลางวัน	137				
13	อกร่อง	1,602	1			
15	อื่นๆ	284				
	รวม	11,899	11	1	3	15 ตัว

เกษตรกร 42 ราย

ต.ศาลาลัย ต.ศิลาลอย ต.ไร่เก่า ต.ไร่ใหม่ อ.สามร้อยยอด จ.ประจวบคีรีขันธ์

ต.สามกระทาย อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์

ต.ห้วยมงคล อ.หัวหิน จ. เพชรบุรี

เกษตรกรราชบุรี 6 ราย

อ.เมือง อ. ปากท่อ อ.วัดเพลง จ.ราชบุรี

ตารางที่ 2 การสำรวจและเก็บผลมะม่วงในการเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่กระจายของด้วงงวงเจาะเมล็ดมะม่วง *Sternochetus* spp. ในแหล่งปลูกภาคเหนือ (มิถุนายน-กรกฎาคม 2551)

	พันธุ์	จำนวนผล	ด้วง	ดักแด้	หนอน	หมายเหตุ
1	แก้ว	93	57	3	2	
2	เขียวมรกต	2,065	89			
6	ทองดำ	35	1			
7	โชคอนันต์	119	4	1		
8	น้ำดอกไม้สีทอง	6				
	รวม	**2,318**	**147**	**3**	**2**	**152 ตัว**

เกษตรกร 5 ราย

ต.เหล่ายาว อ.บ้านโฮ่ง จ.ลำพูน

ต.สันมหาพน อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่

ต.ปิงโค้ง อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่

ต.ป่าไหน่ อ.พร้าว จ.เชียงใหม่

การเฝ้าระวังการแพร่กระจาย ของหนอนเจาะผล, *Cryptophlebia ombrodelta* (Lower) ในลำไย

Distribution of Fruit Borer, *Cryptophlebia ombrodelta* (Lower) on Longan

บุษบง มนัสมั่นคง ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา พวงผกา อ่างมณี
ศิริณี พูนไชยศรี พฤทธิชาติ ปุญวัฒโท เกรียงไกร จำเริญมา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สถานการณ์การแพร่ระบาดของหนอนเจาะผล *Cryptophlebia ombrodelta* (Lower) ในลำไย ดำเนินการสำรวจในแหล่งปลูกจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน ในระยะที่ผลลำไยมีอายุประมาณ 5 เดือน ถึงระยะเก็บเกี่ยว ระหว่างเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม ปี 2551 และ 2552 ผลการสำรวจ ในแหล่งปลูก อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอด (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง จากผลผลิตลำไยที่สุ่ม ปี 2551 จำนวน 28,718 ผล น้ำหนัก 281.51 กิโลกรัม ปี 2552 จำนวน 38,569 ผล น้ำหนัก 391.02 กิโลกรัม พบหนอนที่ลงทำลายผลลำไย 3 ชนิด คือ หนอนกินผล, *Conogethes punctiferalis* หนอนเจาะผล, *Deudorix epijarbas* หนอนเจาะขั้วผล, *Conopomorpha sinensis* แต่ไม่พบหนอนเจาะผลชนิด *C. ombrodelta* ซึ่งต้องรอการยืนยันชนิดจากนักอนุกรมวิธานต่อไป

คำหลัก : การสำรวจเพื่อตรวจหา (Detection surveys) การแพร่กระจาย (Distribution) ลำไย (Longan) หนอนเจาะผล, *Cryptophlebia ombrodelta*

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-02-01-02-51

คำนำ

จากการเปิดเสรีการค้าภายใต้องค์การการค้าโลก (World Tread Organization, WTO) ซึ่งได้ ยกเลิกมาตรการกีดกันทางภาษี และให้ใช้มาตรการทางสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) เป็นมาตรการทดแทน เพื่อให้ประเทศสมาชิกปกป้องมิให้ศัตรูพืชที่อาจจะติดไปกับสินค้าพืชจากประเทศหนึ่งไปสู่อีกประเทศหนึ่ง เป็นการอำนวยความสะดวกด้านการค้าระหว่างประเทศสมาชิก ประเทศไทยเป็นประเทศสมาชิกขององค์การการค้าโลก จึงต้องดำเนินการเพื่อเตรียมความพร้อมในด้านวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการต่อรองทางการค้าสินค้าเกษตรระหว่างประเทศ กรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชซึ่งเป็นหน่วยงานอารักขาพืชแห่งชาติ จึงมีความจำเป็นต้องเตรียมความพร้อมด้านข้อมูล ทางวิทยาศาสตร์ทางด้านพืชดังกล่าวเพื่อใช้ในการเจรจาการค้าสินค้าเกษตรภายใต้เงื่อนไขขององค์การการค้าโลก การสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นงานพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการ ดำเนินการด้านอื่นๆ อีก เช่น Pest Risk Analysis, Establishment for pest free area, Pest list, Pest report เป็นต้น ซึ่งแนวทางการดำเนินงานจะสอดคล้องกับ ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 (Guidelines for Surveillance)

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการผลิตและการตลาดสูง โดยเฉพาะตลาดส่งออกทั้งในรูป ผลไม้สด ผลไม้แช่แข็ง และผลิตภัณฑ์แปรรูป ดังนั้นจึงต้องมีขบวนการผลิตอย่างถูกต้องและเหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีมาตรฐาน มีสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชสามารถแข่งขันในตลาดโลก โดยแหล่งปลูกสำคัญของลำไยอยู่ทางภาคเหนือตอนบน กรมส่งเสริมการเกษตร (2546) ได้รายงานว่า พื้นที่การปลูกลำไย ปีการเพาะปลูก 2546 รวมทั้งประเทศ 618,128 ไร่ ผลผลิตรวม 396,668 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 642 กก./ไร่ โดยมีแหล่งปลูกใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ พื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ จ.เชียงใหม่มีพื้นที่ปลูก 180,770 ไร่ รองลงมา จ.ลำพูน 179,806 ไร่ จ.เชียงราย 70,533 ไร่ ตามลำดับ ลำไยพันธุ์ที่ปลูกมาก ได้แก่ พันธุ์อีดอ แห้ว สีชมพู และเบี้ยวเขียว การผลิตลำไยมักประสบปัญหาการให้ผลผลิตปีเว้นปี ปีที่มีผลผลิตมากมักเกิดปัญหาด้านการตลาด ลำไยสดมีตลาดส่งออกค่อนข้างแคบ เนื่องจากมีข้อจำกัดหลายอย่าง ตลาดสำคัญจึงอยู่เฉพาะในภูมิภาคใกล้เคียง เช่น จีน ฮ่องกง มาเลเซีย และสิงค์โปร์ ตลาดที่ไกลออกไปแต่มีปริมาณไม่มากนัก ได้แก่ แคนาดา อังกฤษ และเนเธอร์แลนด์ ส่วนประเทศที่พัฒนาแล้วมักจะไม่ค่อยรับซื้อ เนื่องจากกลัวปัญหาด้านโรคแมลงที่ติดไปกับผลลำไยหรือ ลิ้นจี่ ก่อนที่จะนำเข้าต้องยื่นคำขอเปิดตลาดพร้อมข้อมูลศัตรูพืช ซึ่งประกอบด้วยรายชื่อและรายละเอียด เกี่ยวกับศัตรูพืช เพื่อที่ประเทศผู้นำเข้าจะนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis, PRA) และอาจจะสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อกำหนดเงื่อนไขการนำเข้า แต่ที่ผ่านมาข้อมูลเหล่านี้ยังขาดอยู่ จึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการวิจัยเพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับแมลงศัตรูพืชดังกล่าว

จากการดำเนินการการขอเปิดตลาดลำไยกับประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งพบข้อมูลว่าลำไย มีหนอนเจาะผล *Cryptophlebia ombrodelta* ลงทำลายด้วย ซึ่งทางประเทศไทยไม่มีข้อมูลศัตรูพืชชนิดนี้ จึงต้องดำเนินการเฝ้าระวังและติดตาม หนอนเจาะผล *Cryptophlebia ombrodelta* ในลำไยเพื่อการส่งออก เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการดำเนินการขอเปิดตลาดการค้าต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงลำไย
2. กรรไกรตัดกิ่ง
3. ถังน้ำแข็ง
4. เครื่องกำหนดพิกัด (GPS)
5. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลง เช่น กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ยางรัดของ vial แอลกอฮอล์ 80% พู่กัน เข็มเขี่ย Label เป็นต้น
6. อุปกรณ์เก็บข้อมูล เช่น กระดาน ดินสอ ปากกาเมจิก เป็นต้น

วิธีการ

ดำเนินการสุ่มเลือกพื้นที่การสำรวจในแหล่งปลูกลำไยทั่วประเทศ และแปลงลำไยในแต่ละจังหวัด โดยใช้วิธี purposive sampling ได้พื้นที่การสุ่มสำรวจ ดังนี้ อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอด (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง (ภาพที่ 1) ดำเนินการสำรวจในช่วงที่ผลลำไยมีอายุ 5 เดือน - ระยะเก็บเกี่ยว ดำเนินการสุ่มสำรวจแมลงในแปลงโดยวิธีการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) คือ สุ่มตัดช่อผลลำไยต้นละ 4 ทิศๆ ละ 1 ช่อ จำนวน 10 ต้น/แปลง ร่วมกับการเก็บตัวอย่างหนอนเจาะผลที่พบลงทำลายผลลำไย นำมาเลี้ยงเพื่อให้เป็นตัวเต็มวัยเพื่อส่งจำแนกต่อไป บันทึกชนิด จำนวนหนอนเจาะผลที่ทำลายผลลำไย จำนวนผลลำไยที่สุ่ม พิกัดพื้นที่ สภาพภูมิอากาศ ข้อมูลพืช และการจัดการ

เวลาและสถานที่

ทำการสุ่มสำรวจระหว่างเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม ปี 2551 และ 2552 ในแหล่งปลูกลำไย จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการสำรวจเพื่อตรวจหาชนิดและการแพร่กระจายของของหนอนเจาะผล *Cryptophlebia ombrodelta* ในลำไย ในแหล่งปลูก อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอต (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง จากผลผลิตลำไยที่สุ่ม ปี 2551 จำนวน 28,718 ผล น้ำหนัก 281.51 กิโลกรัม ปี 2552 จำนวน 38,569 ผล น้ำหนัก 391.02 กิโลกรัม พบหนอนที่ลงทำลายผลลำไย 3 ชนิด (ตารางที่ 1) คือ หนอนกินผล, *C. punctiferalis* หนอนเจาะผล, *D. epijarbas* หนอนเจาะขั้วผล, *C. sinensis* (ภาพที่ 3) แต่ไม่พบหนอนเจาะผลชนิด *C. ombrodelta* ซึ่งต้องรอการยืนยันชนิดจากนักอนุกรมวิธานต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

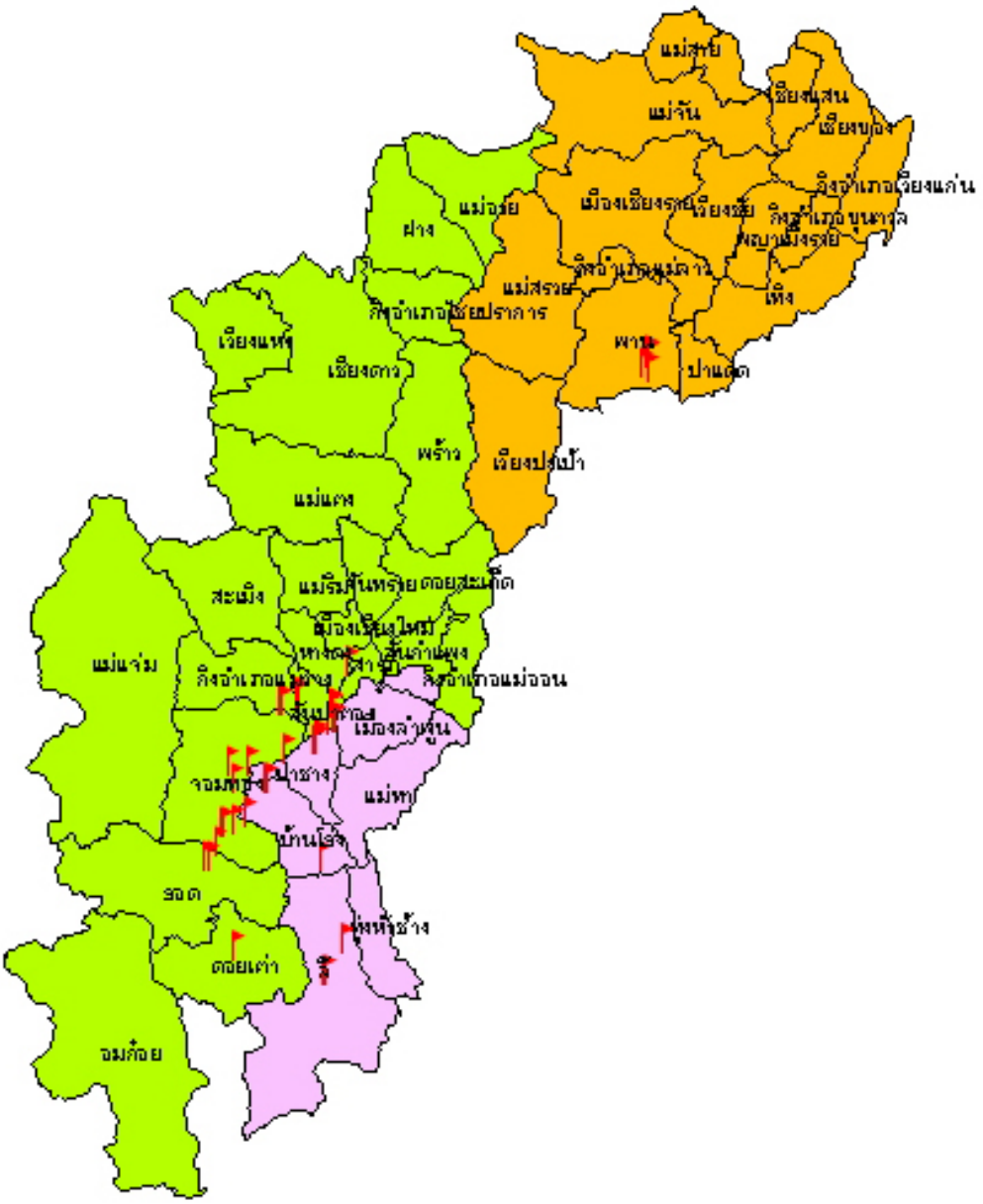
ขอขอบคุณ คุณชญาน์นันท์ โค้วอินทร์ ส่วนถ่ายทอดเทคโนโลยี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ และเจ้าหน้าที่เกษตรหลวง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่ช่วยประสานงานในการเข้าพื้นที่ คุณสุริยะ เกาะม่วงหมู่ เจ้าหน้าที่วิเคราะห์โครงการ คุณณิชาพร ฉ่ำประวิง และ นายวรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูล นักวิชาการเกษตร ที่ช่วยดำเนินการสำรวจและเก็บข้อมูลในแปลง ตลอดจนรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นจึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จริยา วิสิทธิ์พานิช ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2545. โรคและแมลงศัตรูลำไย ลิ้นจี่ และมะม่วง. หจก.ธนบรรณการพิมพ์, จังหวัดเชียงใหม่. 308 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546. สถิติการปลูกลำไย รายจังหวัด ปีการเพาะปลูก 2546. http://www.doae.go.th/temp.asp?gpg=data/kasetfx

ภาพที่ 1 แผนที่แสดงจุดสำรวจหนอนเจาะผลในแปลงลำไยของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน จำนวน 51 แปลง ปี 2551



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงจุดสำรวจหนอนเจาะผลในแปลงลำไยของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน จำนวน 51 แปลง ปี 2552

ตารางที่ 1 แสดงผลการสำรวจหนอนเจาะผลในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย ระหว่างเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม ปี 2551 และ 2552

จุดสำรวจ	หนอนเจาะขั้ว *Conopomorpha sinensis* Bradley		หนอนเจาะผล *Deudorix epijarbas* Moore		หนอนกินผลลำไย *Conogethes punciferalis*	
	2551	2552	2551	2552	2551	2552
จ.เชียงใหม่ (25 แปลง)						
- อ.พร้าว (3)	+	+	-	-	-	-
- อ.จอมทอง (6)	+	+	+	+	+	-
- อ.ดอยเต่า (2)	-	-	-	-	+	+
- อ.ฮอด (2)	-	-	-	-	-	-
- อ.สารภี (3)	-	-	-	-	+	-
- อ.หางดง (2)	-	-	-	-	-	-
- อ.สันป่าตอง (3)	-	-	-	-	-	-
- อ.แม่วาง (2)	-	-	-	-	+	+
- อ.ดอยหล่อ (2)	-	-	-	-	+	+
จ.ลำพูน (18 แปลง)						
-อ.เวียงหนองล่อง (3)	-	-	+	+	-	+
- อ.ป่าซาง (5)	+	-	+	-	+	-
- อ.ลี้ (4)	+	-	+	+	+	+
- อ.บ้านโฮ่ง (3)	+	-	-	+	+	-
- อ.เมืองลำพูน (3)	+	-	+	-	+	-
จ.เชียงราย (8 แปลง)						
- อ.พาน (8)	-	-	+	-	+	+

[1/] + = พบ, - = ไม่พบ

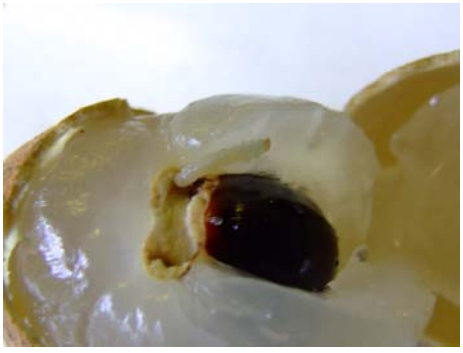
หนอน *Deudorix epijarbas*

ผีเสื้อเพศผู้ *Deudorix epijarbas*

ผีเสื้อเพศเมีย *Deudorix epijarbas*

หนอน *Conogethes punciferalis*

ตัวเต็มวัย *Conogethes punciferalis*



หนอน *Conopomorpha sinensis*

ภาพที่ 3 หนอนเจาะผลในแปลงลำไยของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน ระหว่างเดือนมิถุนายน - กรกฎาคม ปี 2551 และ 2552

สถานการณ์การแพร่กระจายของเพลี้ยแป้ง *Cataenococcus hispidus* Green และ*Planococcus lichi* Cox ในลำไย

Distribution of mealybug, *Cataenococcus hispidis* Green and *Planococcus lichi* Cox on Longan

ศรีจำนรรจ์ ศรีจันทรา บุษบง มนัสมั่นคง พวงผกา อ่างมณี ชลิดา อุณหวุฒิ ชมัยพร บัวมาศ วนาพร วงษ์นิคง สัญญาณี ศรีคชา เกรียงไกร จำเริญมา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สถานการณ์การแพร่ระบาดของเพลี้ยแป้ง, *Cataenococcus hispidus* Green และ *Planococcus lichi* Cox ในลำไย ดำเนินการสำรวจในแหล่งปลูกจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน ในระยะที่ผลลำไยมีอายุประมาณ 5 เดือน ถึงระยะเก็บเกี่ยว ในปี 2551 และปี 2552 ผลการสำรวจ ในแหล่งปลูก อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอต (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง จากผลผลิตลำไยที่สุ่ม 281.51 กิโลกรัม จำนวน 28,718 ผล ในปี 2551 และ 391 กิโลกรัม จำนวน 38,569 ผล ในปี 2552 พบเพลี้ยแป้งที่ลงทำลายผลพบประมาณ 4 ชนิด คือ *Nipaecoccus* sp. *Pseudococccus* sp. *Ferrisia vergata* และ Unknown ซึ่งต้องรอการยืนยันชนิดจากนักอนุกรมวิธานอีกครั้งหนึ่ง แต่ไม่พบการลงทำลายของเพลี้ยแป้งชนิด *C. hispidis* เลย

คำหลัก : การสำรวจเพื่อตรวจหา (Detection surveys) การแพร่กระจาย (Distribution) ลำไย (Longan) เพลี้ยแป้ง (Mealy bug) *Cataenococcus hispidis* Green *Planococcus lichi* Cox

---

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-02-01-03-51

คำนำ

จากการเปิดเสรีการค้าภายใต้องค์การการค้าโลก (World Tread Organization, WTO) ซึ่งได้ ยกเลิกมาตรการกีดกันทางภาษี และให้ใช้มาตรการทางสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS Agreement) เป็นมาตรการทดแทน เพื่อให้ประเทศสมาชิกปกป้องมิให้ศัตรูพืชที่อาจจะติดไปกับสินค้าพืชจากประเทศหนึ่งไปสู่อีกประเทศหนึ่ง เป็นการอำนวยความสะดวกด้านการค้าระหว่างประเทศสมาชิก ประเทศไทยเป็นประเทศสมาชิกขององค์การการค้าโลก จึงต้องดำเนินการเพื่อเตรียมความพร้อมในด้านวิทยาศาสตร์ เพื่อใช้ในการต่อรองทางการค้าสินค้าเกษตรระหว่างประเทศ กรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชซึ่งเป็นหน่วยงานอารักขาพืชแห่งชาติ จึงมีความจำเป็นต้องเตรียมความพร้อมด้านข้อมูล ทางวิทยาศาสตร์ทางด้านพืชดังกล่าวเพื่อใช้ในการเจรจาการค้าสินค้าเกษตรภายใต้เงื่อนไขขององค์การการค้าโลก การสำรวจ ติดตามและตรวจสอบศัตรูพืชเป็นงานพื้นฐานที่มีความจำเป็นสำหรับใช้ในการ ดำเนินการด้านอื่นๆ อีก เช่น Pest Risk Analysis, Establishment for pest free area, Pest list, Pest report เป็นต้น ซึ่งแนวทางการดำเนินงานจะสอดคล้องกับ ISPMs (International Standard for Phytosanitary Measures) ฉบับที่ 6 (Guidelines for Surveillance)

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพในการผลิตและการตลาดสูง โดยเฉพาะตลาดส่งออกทั้งในรูป ผลไม้สด ผลไม้แช่แข็ง และผลิตภัณฑ์แปรรูป ดังนั้นจึงต้องมีขบวนการผลิตอย่างถูกต้องและเหมาะสม เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีมาตรฐาน มีสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชสามารถแข่งขันในตลาดโลก โดยแหล่งปลูกสำคัญของลำไยอยู่ทางภาคเหนือตอนบน กรมส่งเสริมการเกษตร (2546) ได้รายงานว่า พื้นที่การปลูกลำไย ปีการเพาะปลูก 2546 รวมทั้งประเทศ 618,128 ไร่ ผลผลิตรวม 396,668 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 642 กก./ไร่ โดยมีแหล่งปลูกใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคเหนือ พื้นที่ปลูกมากที่สุด คือ จ.เชียงใหม่มีพื้นที่ปลูก 180,770 ไร่ รองลงมา จ.ลำพูน 179,806 ไร่ จ.เชียงราย 70,533 ไร่ ตามลำดับ ลำไยพันธุ์ที่ปลูกมาก ได้แก่ พันธุ์อีดอ แห้ว สีชมพู และเบี้ยวเขียว การผลิตลำไยมักประสบปัญหาการให้ผลผลิตปีเว้นปี ปีที่มีผลผลิตมากมักเกิดปัญหาด้านการตลาด ลำไยสดมีตลาดส่งออกค่อนข้างแคบ เนื่องจากมีข้อจำกัดหลายอย่าง ตลาดสำคัญจึงอยู่เฉพาะในภูมิภาคใกล้เคียง เช่น จีน ฮ่องกง มาเลเซีย และสิงค์โปร์ ตลาดที่ไกลออกไปแต่มีปริมาณไม่มากนัก ได้แก่ แคนาดา อังกฤษ และเนเธอร์แลนด์ ส่วนประเทศที่พัฒนาแล้วมักจะไม่ค่อยรับซื้อ เนื่องจากกลัวปัญหาด้านโรคแมลงที่ติดไปกับผลลำไยหรือ ลิ้นจี่ ก่อนที่จะนำเข้าต้องยื่นคำขอเปิดตลาดพร้อมข้อมูลศัตรูพืช ซึ่งประกอบด้วยรายชื่อและรายละเอียด เกี่ยวกับศัตรูพืช เพื่อที่ประเทศผู้นำเข้าจะนำไปวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis, PRA) และอาจจะสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อกำหนดเงื่อนไขการนำเข้า แต่ที่ผ่านมาข้อมูลเหล่านี้ยังขาดอยู่ จึงมีความจำเป็นต้องดำเนินการวิจัยเพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับแมลงศัตรูพืชดังกล่าว

จากการดำเนินการการขอเปิดตลาดลำไยกับประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้ส่งข้อมูลที่พบว่าลำไย มีเพลี้ยแป้งชนิด *C. hispidus* และ *P. lichi* ลงทำลายด้วย ซึ่งทางประเทศไทยไม่มีข้อมูลศัตรูพืชทั้งสองชนิด จึงต้องดำเนินการเฝ้าระวังและติดตาม เพลี้ยแป้ง *C. hispidus* และ *P. lichi* ในลำไยเพื่อการส่งออก เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการดำเนินการขอเปิดตลาดการค้าต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. แปลงลำไย
2. กรรไกรตัดกิ่ง
3. ถังน้ำแข็ง
4. เครื่องกำหนดพิกัด (GPS)
5. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลง เช่น กล่องพลาสติก ถุงพลาสติก ยางรัดของ vial แอลกอฮอล์ 80% พู่กัน เข็มเขี่ย Label เป็นต้น
6. อุปกรณ์ทำตัวอย่างแมลง เช่น slide KOH น้ำกลั่น แอลกอฮอล์ 95% สารละลาย carbo xylene กรดแอลกอฮอล์ น้ำยาย้อมสี สารละลายเอ็น-บิวทิวแอลกอฮอล์ กระดาษกรอง ตู้อบ เป็นต้น
7. อุปกรณ์เก็บข้อมูล เช่น กระดาน, ดินสอ, ปากกาเมจิก เป็นต้น

วิธีการ

<u>ปี 2551-2552</u>

ดำเนินการสุ่มเลือกพื้นที่การสำรวจในแหล่งปลูกลำไยทั่วประเทศ และแปลงลำไยในแต่ละจังหวัด โดยใช้วิธี purposive sampling ได้พื้นที่การสุ่มสำรวจ ดังนี้ อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอต (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง ดำเนินการสำรวจในช่วงที่ผลลำไยมีอายุ 5 เดือน - ระยะเก็บเกี่ยว ดำเนินการสุ่มสำรวจแมลงในแปลงโดยวิธีการสุ่มอย่างง่าย (simple random sampling) คือ สุ่มตัดช่อผลลำไยต้นละ 4 ทิศๆ ละ 1 ช่อ จำนวน 10 ต้น/แปลง ร่วมกับการเก็บผลที่พบการทำลายของเพลี้ยแป้งจากต้นลำไยโดยตรง เก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งที่ได้ในแอลกอฮอล์ 80% บันทึกชนิดและจำนวนเพลี้ยแป้งที่ทำลายผลลำไย จำนวนผลลำไยที่สุ่ม พิกัดพื้นที่ สภาพภูมิอากาศ และข้อมูลพืชและการจัดการ

เวลาและสถานที่

ทำการสุ่มสำรวจระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2551 และ 2552 ในแหล่งปลูกลำไย จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปี 2551

ผลการสำรวจเพื่อตรวจหาชนิดและการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้ง *C. hispidus* และ *P. lichi* ปี 2551 ในแหล่งปลูก อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอต (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง (ภาพที่ 1) จากผลผลิตลำไยที่สุ่มทั้งหมด 281.51 กิโลกรัม จำนวน 28,718 ผล พบเพลี้ยแป้งที่ลงทำลายผลลำไยทุกจุดสำรวจ (ตารางที่ 1) โดยคาดว่าจะพบเพลี้ยแป้งประมาณ 4 ชนิด (ภาพที่ 3) คือ *Nipaecoccus* sp. *Ferrisia vergata Pseudococcus* sp. และเพลี้ยแป้งไม่ทราบชนิด (Unknown) 1 ชนิด ซึ่งต้องรอการยืนยันชนิดจากนักอนุกรมวิธาน โดยจริยาและคณะ (2545) รายงานว่าเพลี้ยแป้งที่ลงทำลายผลลำไยในประเทศไทย คือ เพลี้ยแป้งชนิด *Nipaecoccus* sp.

ปี 2552

ผลการสำรวจเพื่อตรวจหาชนิดและการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้ง *C. hispidus* และ *P. lichi* ในแหล่งปลูก อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอต (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง (ภาพที่ 2) จากผลผลิตลำไยที่สุ่มทั้งหมด 391 กิโลกรัม จำนวน 38,569 ผล พบเพลี้ยแป้งเกือบทุกจุดสำรวจ ยกเว้นจุดสำรวจใน อำเภอหางดง (2) จ.เชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) และอำเภอเมือง (3) จังหวัดลำพูน (ตารางที่ 1) และจากการจำแนกเบื้องต้นจากการสุ่มตัดช่อผลลำไยต้นละ 4 ทิศๆ ละ 1 ช่อ จำนวน 10 ต้น/แปลง ที่จังหวัดเชียงใหม่พบเพลี้ยแป้งชนิด *Pseudococcus* sp. ค่อนข้างมาก โดยพบใน อำเภอพร้าว จอมทอง ดอยเต่า ฮอด สารภี สันป่าตอง และแม่วาง ชนิด *Nipaecoccus* sp. พบใน อำเภอจอมทอง ส่วน Unknown พบใน อำเภอพร้าว ฮอด สารภี และแม่วาง จังหวัดลำพูนพบเพลี้ยแป้งชนิด *Pseudococcus* sp. ที่อำเภอป่าซาง และอำเภอลี้ และพบ Unknown ที่อำเภอเวียงหนองล่อง และพบเพลี้ยแป้งชนิด *Nipaecoccus* sp. *Ferrisia vergata Pseudococcus* sp. และ Unknown ที่อำเภอพาน จังหวัดเชียงราย (ตารางที่ 2 ,ภาพที่ 3)

โดยจากการสำรวจในปี 2552 พบว่าปีนี้ผลผลิตลำไยออกมากกว่าปี 2551 ขนาดผลมีขนาดเล็กกว่า และพบปริมาณและชนิดของเพลี้ยแป้งบนผลลำไยน้อยกว่าปี 2551

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจเพื่อตรวจหาชนิดและการแพร่กระจายของเพลี้ยแป้ง *Cataenococcus hispidus* Green และ *Planococcus lichi* Cox ในแหล่งปลูกลำไยในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูนและเชียงราย ในปี 2551 และปี 2552 อำเภอพร้าว (3) จอมทอง (6) ดอยเต่า (2) ฮอต (2) สารภี (3) หางดง (2) สันป่าตอง (3) แม่วาง (2) และดอยหล่อ (2) จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอบ้านโฮ่ง (3) ป่าซาง (5) เมืองลำพูน (3) ลี้ (4) และเวียงหนองล่อง (3) จังหวัดลำพูน และอำเภอพาน (8) จังหวัดเชียงราย รวม 51 แปลง ไม่พบการลงทำลายของเพลี้ยแป้งชนิด *C. hispidus* เลย พบการลงทำลายของเพลี้ยแป้ง 4 ชนิด คือ *Nipaecoccus* sp. *Ferrisia vergata* *Pseudococcus* sp. และเพลี้ยแป้งซึ่งยังจำแนกชนิดไม่ได้ (Unknown) อีก 1 ชนิด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณชญาน์นันท์ โค้วอินทร์ ส่วนถ่ายทอดเทคโนโลยี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่ และเจ้าหน้าที่เกษตรหลวง ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่ช่วยประสานงานในการเข้าพื้นที่ คุณสุริยะ เกาะม่วงหมู่ เจ้าหน้าที่วิเคราะห์โครงการ คุณณิชาพร ฉ่ำประวิง และ นายวรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูล นักวิชาการเกษตร ที่ช่วยดำเนินการสำรวจและเก็บข้อมูลในแปลง ตลอดจนรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นจึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

จริยา วิสิทธิ์พานิช ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2545. โรคและแมลงศัตรูลำไย ลิ้นจี่ และมะม่วง. หจก.ธนบรรณการพิมพ์, จังหวัดเชียงใหม่. 308 หน้า.

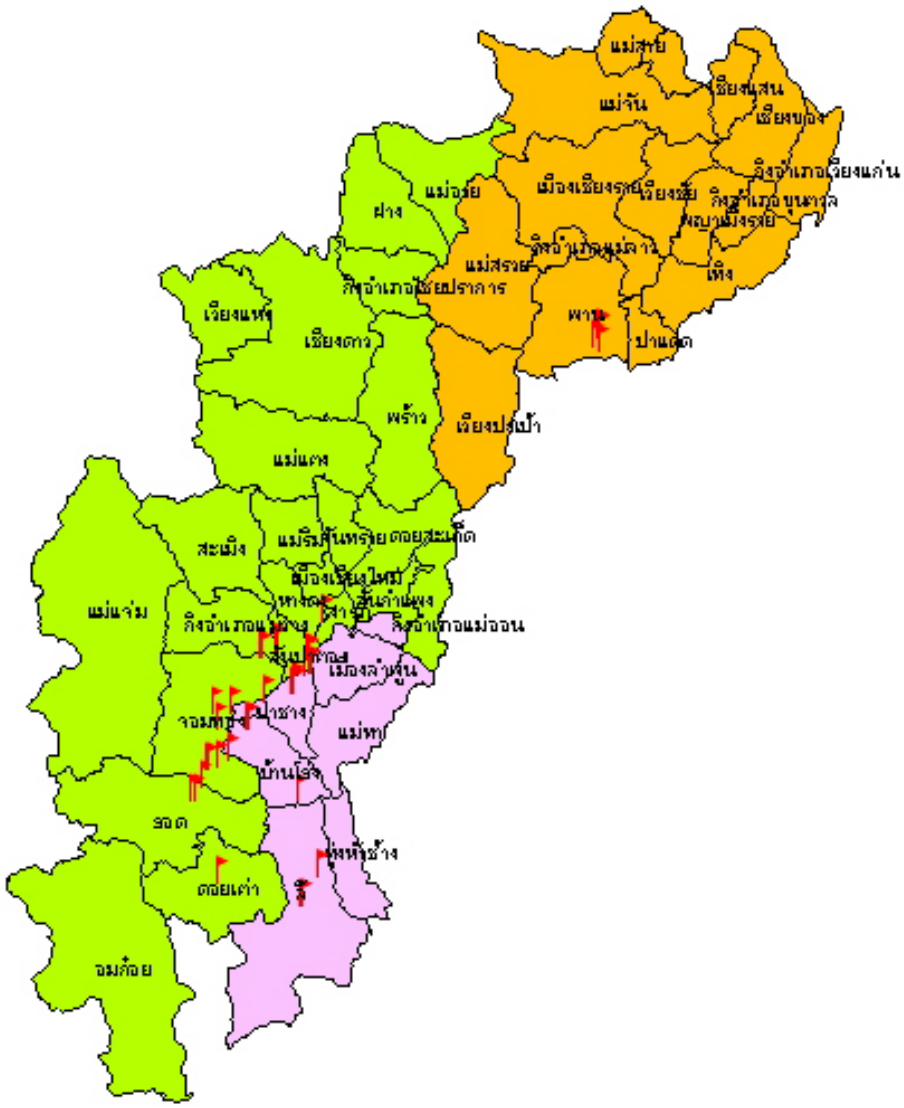
กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546. สถิติการปลูกลำไยรายจังหวัด ปีการเพาะปลูก 2546. http://www.doae.go.th/temp.asp?gpg=data/kasetfx

ภาพที่ 1 แผนที่แสดงจุดสำรวจเพลี้ยแป้งในแปลงลำไยของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน จำนวน 51 แปลง ปี 2551

ตารางที่ 1 แสดงผลการสำรวจเพลี้ยแป้งในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย มิถุนายน-กรกฎาคม 2551 และ 2552

จุดสำรวจ	ปี 2551	ปี 2552
จ.เชียงใหม่ (25 แปลง)		
- อ.พร้าว (3)	+ [1/]	+
- อ.จอมทอง (6)	+	+
- อ.ดอยเต่า (2)	+	+
- อ.ฮอด (2)	+	+
- อ.สารภี (3)	+	+
- อ.หางดง (2)	+	-
- อ.สันป่าตอง (3)	+	+
- อ.แม่วาง (2)	+	+
- อ.ดอยหล่อ (2)	+	+
จ.ลำพูน (18 แปลง)		
- อ.เวียงหนองล่อง (3)	+	+
- อ.ป่าซาง (5)	+	+
- อ.ลี้ (4)	+	+
- อ.บ้านโฮ่ง (3)	+	-
- อ.เมืองลำพูน (3)	+	-
จ.เชียงราย (8 แปลง)		
- อ.พาน (8)	+	+

[1/] + = พบ, - = ไม่พบ



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงจุดสำรวจเพลี้ยแป้งในแปลงลำไยของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน จำนวน 51 แปลง ปี 2552

ตารางที่ 2 แสดงผลการสำรวจเพลี้ยแป้งในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย มิถุนายน-กรกฎาคม 2552 (เบื้องต้น)

จุดสำรวจ	เพลี้ยแป้ง			
	Nipaecoccus	*Ferrisia*	*Pseudococcus*	Unknown
จ.เชียงใหม่ (25 แปลง)				
- อ.พร้าว (3)	-	-	+	+[1/]
- อ.จอมทอง (6)	+	-	+	-
- อ.ดอยเต่า (2)	-	-	+	-
- อ.ฮอด (2)	-	-	+	+
- อ.สารภี (3)	-	-	+	+
- อ.หางดง (2)	-	-	-	-
- อ.สันป่าตอง (3)	-	-	+	-
- อ.แม่วาง (2)	-	-	+	+
- อ.ดอยหล่อ (2)	-	-	-	+
จ.ลำพูน (18 แปลง)				
- อ.เวียงหนองล่อง (3)	-	-	-	+
- อ.ป่าซาง (5)	-	-	+	-
- อ.ลี้ (4)	-	-	+	-
- อ.บ้านโฮ่ง (3)	-	-	-	-
- อ.เมืองลำพูน (3)	-	-	-	-
จ.เชียงราย (8 แปลง)				
- อ.พาน (8)	+	+	+	+

[1/] + = พบ, - = ไม่พบ

Nipaecoccus sp.

Pseudococcus sp.

Ferrisia vergata

Unknown

ภาพที่ 3 เพลี้ยแป้งชนิดที่พบในแปลงสำรวจของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน มิถุนายน-กรกฎาคม 2551

เฝ้าระวังการแพร่กระจายของ *Conyza canadensis* (L.) Cronq.ในประเทศไทย

Surveillance of *Conyza canadensis* (L.) Cronq. Distribution in Thailand.

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์[1] **จรัญญา ปิ่นสุภา**[1] **เบญจมาภรณ์ ลิ้มประเสริฐ**[2]
มัตติกา ทองรส[3]
[1] **สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**
[2]**สำนักการเกษตรอำเภอดำเนินสะดวก** [3]**สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่** 6

บทคัดย่อ

การสำรวจติดตามการเกิดขึ้นหรือการไม่ปรากฏของ *Conyza canadensis* (L.) Cronq. ได้ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึงกันยายน 2552 พื้นที่สำรวจนั้นมีทั้งพื้นที่ทำการเกษตร เช่น แปลงปลูกพืชไร่ พืชผัก และไม้ดอกเมืองหนาว กับพื้นที่ที่ไม่ได้ทำการเกษตรของประเทศไทย โดยแบ่งเป็น 6 ภาค คือ **ภาคเหนือ** : จังหวัดเชียงราย แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ น่าน ลำพูน แพร่ และอุตรดิตถ์ **ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ** : ที่จังหวัดเลย หนองคาย นครพนม สกลนคร มุกดาหาร ขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม นครราชสีมา ชัยภูมิ บุรีรัมย์ สุรินทร์ และอุบลราชธานี **ภาคตะวันตก** : จังหวัดตาก กาญจนบุรี ราชบุรี เพชรบุรี **ภาคกลาง** : จังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ อุทัยธานี สุพรรณบุรี สมุทรสงคราม ฉะเชิงเทรา **ภาคตะวันออก** : จังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว ชลบุรี ระยอง จันทบุรี และตราด **ภาคใต้** : จังหวัดระนอง สุราษฎร์ธานี และภูเก็ต จากการสำรวจพบจ้อล่อ *Conyza sumantrensis* (Retz.) Walker ในพื้นที่ทั้ง 6 ภาคที่สำรวจ ส่วนใหญ่พบกระจัดกระจายอยู่ในที่ไม่ได้ทำการเกษตร สำหรับพื้นที่ทำการเกษตรจะพบในแปลงปลูกพืชไร่ พืชผักและพืชอุตสาหกรรม เช่นสวนยางพารา และสวนปาล์มน้ำมันเป็นต้น และลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่ที่พบจ้อล่อ จะมีความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงระดับความสูงมากกว่า 1,000 เมตร จากระดับน้ำทะเล นอกจากนี้พบตามข้างทางและและบริเวณรอบนอกของส่วนป่าและที่สำคัญคือไม่พบการแพร่กระจายของ *Conyza canadensis* (L.) Cronq

---

รหัสโครงการวิจัย 07 01 51 01

คำนำ

การเฝ้าระวัง (surveillance) หมายถึง กระบวนที่เป็น**ทางการ**เพื่อรวบรวมและบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดขึ้นของศัตรูพืช หรือ**การไม่มีปรากฏ**โดย**การสำรวจการติดตาม**หรือวิธีอื่น ๆ (นิรนาม,2006) เพื่อจะได้ทราบสถานภาพของศัตรูพืชโดยเฉพาะศัตรูพืชต่างถิ่นซึ่งหมายถึงสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น พืช สัตว์ และแมลงเป็นต้น ที่ถูกนำเข้าจากแหล่งกำเนิดต่างๆ โดยจะตั้งใจหรือไม่ก็ตาม และศัตรูพืชเหล่านี้สามารถอยู่รอดในสิ่งแวดล้อมใหม่ ปรับตัวเจริญเติบโตกลายเป็นปัญหาในท้องถิ่นหรือแหล่งที่เข้าไปอยู่ใหม่ ในที่นี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะวัชพืช วัชพืชต่างถิ่นมากมายหลายชนิดได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทย เช่น ผักตบชวา หญ้าขจรจบ สาบเสือ หญ้ายาง และไมยราบยักษ์ เป็นต้น พืชดังกล่าวได้กลายเป็นวัชพืชของประเทศไทยก่อให้เกิดปัญหาทั้งในพื้นที่ทำการเกษตร และไม่ได้ทำการเกษตร ในแง่ของเศรษฐกิจเราต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมหาศาลในการกำจัด นอกจากนี้ยังมีผลกระทบด้านอื่น ๆ อีกซึ่งไม่ได้กล่าวในที่นี้

อย่างไรก็ตามปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวข้างต้นนั้นสามารถป้องกันได้ด้วยมาตรการทางกฎหมาย เพื่อป้องกันไม่ให้มีการนำพืชที่มีประวัติเป็นวัชพืชร้ายแรงในหลาย ๆ ประเทศ หรือมีศักยภาพที่จะเป็นวัชพืชร้ายแรงเข้ามาในประเทศ กรมวิชาการเกษตรในฐานะที่มีหน้าที่โดยตรงในเรื่องการระบาดของศัตรูพืชก็ได้ดำเนินการทางด้านกฎหมาย แต่มาตรการกฎหมายอย่างเดียวนั้นจะประสบความสำเร็จได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต้องอาศัยความร่วมมือจากประชาชน โดยประชาชนต้องไม่เป็นผู้ทำการแพร่กระจายพันธุ์วัชพืชที่มีปัญหา และการเฝ้าระวังติดตามการระบาดของพืชหรือวัชพืชต่างถิ่น ซึ่งจะได้กล่าวถึงบทบาทของกรมวิชาการเกษตรในฐานะที่เป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization) (NPPO) ต่อไป

ตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัย(International Standard for Phytosanitary Measures) (ISPM) no.5 (นิรนาม,2006) ได้อธิบายความหมายของ**ศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest)** ไว้ว่า คือศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพต่อ**พื้นที่ที่อยู่ในอันตราย**นั้น และยังไม่มีอยู่ในที่นั้น หรือมีอยู่แต่ไม่แพร่กระจายอย่างกว้างขวาง และกำลังมี**การควบคุมอยู่อย่างเป็นทางการ** (นิรนาม,2006) และอีกคำที่มักพบในเรื่องที่เกี่ยวกับการกักกันพืชคือ **สิ่งต้องห้าม (prohibited articles)** ซึ่งหมายถึง ส่วนของพืชหรือพาหะการนำเข้ามีความเสี่ยงสูงที่ศัตรูพืชร้ายแรงจะถูกนำเข้ามา (introduced) เจริญแพร่พันธุ์อย่างถาวร (establish) แพร่กระจาย (spread) และก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจติดตามมาภายหลัง ข้อความทั้ง 2 ดังกล่าวคือ **ศัตรูพืชกักกัน** และ**สิ่งต้องห้าม** จะปรากฏอยู่ในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป

กรมวิชาการเกษตรได้ยกร่าง**ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์** 3 ฉบับที่ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกักพืช และได้ส่งให้สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร

แห่งชาติ (มกอช.) เพื่อแจ้งให้ประเทศสมาชิกองค์การค้าโลกทราบและแสดงความคิดเห็นกับ **ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์**ดังกล่าว ประเทศออสเตรเลียเป็นหนึ่งในประเทศสมาชิกที่ให้ข้อคิดเห็นเกี่ยวกับสถานะภาพของศัตรูพืช ตามที่ได้ระบุในท้ายประกาศกระทรวงฯ คือข้อความในข้อ 2 " ที่ให้ศัตรูพืชจากทุกแหล่งตามท้ายประกาศนี้ เป็น**สิ่งต้องห้าม** เนื่องจากเป็น**ศัตรูพืชกักกัน**" ซึ่งเป็นข้อความในประกาศกระทรวงฯเรื่อง"กำหนดศัตรูพืชเป็น**สิ่งต้องห้าม**ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 " ที่ได้ประกาศ ณ วันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2550 ศัตรูพืชที่ประเทศออสเตรเลียได้ให้ข้อคิดเห็นนั้น ได้กล่าวถึงรายงานการแพร่กระจายของโรคพืช และวัชพืชหลายชนิดในประเทศไทยที่อยู่ในท้ายประกาศกระทรวงฯ ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะวัชพืช 2 ชนิด คือ *Conyza canadensis* (L.) Cronq. และจอกหูหนูยักษ์ (*Salvinia molesta* Mitchell) ดังนั้นจึงขอตัดรายชื่อวัชพืชทั้งสองออกจากบัญชีรายชื่อศัตรูพืชกักกันในประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ดังกล่าว

การชี้แจงต่อข้อคิดเห็นของประเทศออสเตรเลียในขั้นต้นนั้น กรมวิชาการเกษตรโดยกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้รายงานว่าไม่พบรายงานการแพร่กระจายของ *C.canadensis* (L.) Cronq.ในประเทศไทย ส่วนจอกหูหนูยักษ์นั้นในปี พ.ศ. 2549 พบการระบาดของจอกหูหนูยักษ์ในบริเวณหนองน้ำขนาดเล็กพื้นที่ประมาณ 100 ตารางเมตร ที่ตำบลสะเดา อำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา แต่ได้มีการกำจัดและมีวิธีการควบคุมอย่างเป็นทางการแล้ว ดังนั้น กรมวิชาการเกษตร จึงขอยืนยันให้คงชื่อของวัชพืชทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวในบัญชีรายชื่อของศัตรูพืชกักกันของประเทศไทยตามประกาศ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

อย่างไรก็ตามเมื่อมีข้อคิดเห็นที่แตกต่างของประเทศสมาชิกองค์การค้าโลก และเพื่อให้ได้ข้อมูลสถานะภาพของ *C.caradensis* (L.) Cronq. และจอกหูหนูในประเทศไทยจึงควรมีงานวิจัยและทำการสำรวจ เฝ้าระวังการแพร่กระจายของวัชพืชทั้งสองชนิด เพื่อจะได้ใช้เป็นหลักฐานทางวิชาการตามมาตรฐานสากล ในการอ้างอิงข้อมูลด้านศัตรูพืชกักกันต่อไป

ดังนั้น สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จึงได้มีโครงการวิจัยเกี่ยวกับการเฝ้าระวังการระบาดของวัชพืชกักกัน หรือวัชพืชชนิดที่มีศักยภาพเป็นวัชพืชร้ายแรง เพื่อติดตามเฝ้าระวัง รวมถึงงานวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้เป็นการเฝ้าระวังการระบาดของ *C.canadensis* (L.) Cronq. ซึ่งจะได้ข้อมูลสถานภาพ *C. canadensis* ที่เป็นปัจจุบัน ซึ่งจะเป็นข้อมูลอ้างอิงในกรณีที่มีปัญหา หรือข้อคิดเห็นที่ข้อขัดแย้งกันระหว่างประเทศสมาชิกในองค์การค้าโลกต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เลนส์ขยาย และกล้องบันทึกภาพ
2. วัสดุและอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างพรรณไม้
3. เอกสาร ตำราในการจำแนกพืช และภาพถ่ายของ *Conyza canadensis* (L.) Cronq.

วิธีการ

1. การค้นคว้าและรวบรวมข้อมูล

ค้นคว้าเอกสาร เกี่ยวกับการจำแนกพันธุ์ (species) ของพืชในสกุล *Conyza* และรายงานการแพร่กระจายกับปัญหาของ *C. canadensis* (L.) Cronq. *และ C. sumatrensis* (Retz.) Walker

2. การสำรวจติดตามการระบาดของ *C.canadensis* (L.) Cronq.

แผนการสำรวจการปรากฏหรือไม่ปรากฏของ *C. canadensis* (L.) Cronq. ในประเทศไทยนั้น ได้สำรวจทั้งในพื้นที่ทำการเกษตร และไม่ได้ทำการเกษตร รวมถึงริมถนนตามแนวชายป่าตามภาคต่าง ๆ ซึ่งได้แบ่งตามที่ได้กำหนดในอักขรานุกรมภูมิศาสตร์ของราชบัณฑิตสภา บัณฑิตสภา เล่มที่ 1 ปี 2552 หน้า 3-18 (http:www.thaihomaster.com/showinformation.phy?TYPE=I&ID=464)ดังนี้

ภาคเหนือ : จังหวัดเชียงราย ที่อำเภอเวียงแก่น เทิง เชียงแสน แม่สรวย และเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงใหม่ ที่อำเภอเชียงดาว ฝาง ไชยปราการ แม่ริม สันทราย จังหวัดลำพูน กิ่งอำเภอทุ่งหัวช้าง บ้านโฮ่ง จังหวัดแม่ฮ่องสอน ที่อำเภอเมือง แม่สะเรียง ขุนยวม ปางมะผ้า และปาย จังหวัดน่านที่อำเภอเมือง เชียงกลาง ทุ่งช้าง ปัว และบ่อเกลือ จังหวัดแพร่ ที่อำเภอเมือง สูงเม่น และเด่นชัย และ จังหวัดอุตรดิตถ์ ที่อำเภอเมือง และตรอน

ภาคตะวันตก : จังหวัดตากที่อำเภอ พบพระ แม่สอด และอุ้มผาง จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอท่าม่วง ด่านมะขามเตี้ย พนมทวน ไทรโยค ศรีสวัสดิ์ ทองผาภูมิ และสังขละบุรี จังหวัดราชบุรี อำเภอเมือง ดำเนินสะดวก โพธาราม และสวนผึ้ง และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ อำเภอสามร้อยยอด และกุยบุรี

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : จังหวัดเลยที่อำเภอนาแห้ว ด่านซ้าย ท่าลี่ เชียงคาน และ ปากชม จังหวัดหนองคายที่อำเภอเมือง สังคมท่าบ่อ ศรีเชียงใหม่โพนพิสัย บากตาด และบึงกาฬ จังหวัดนครพนมที่อำเภอเมือง ธาตุพนม นาแก ปลาปาก และเรณูนคร จังหวัดสกลนครที่อำเภอเมือง กุดบาก พังโคน ภูพาน และสว่างดินแดน จังหวัดมุกดาหารที่อำเภอเมือง นิคมคำสร้อย และดงหลวง จังหวัดขอนแก่นที่อำเภอเมือง ชุมแพร น้ำพอง พล มัญจคีรี และภูเวียง จังหวัดกาฬสินธุ์ที่อำเภอเมือง และยางตลาด จังหวัดมหาสารคามที่อำเภอเมือง โกสุมพิสัย และบรบือ จังหวัดนครราชสีมาที่

อำเภอปากช่อง เมือง ปักธงชัย โชคชัย ด่านขุนทด จักราชห้วยแถลง บัวใหญ่ และพิมาย จังหวัดชัยภูมิที่อำเภอเมือง เกษตรสมบูรณ์ คอนสวรรค์ จัตุรัส และภูเวียง จังหวัดบุรีรัมย์ ที่อำเภอเมือง ลำปลายมาศ หนองกี่ พุทไธสง และนาโพธิ์ จังหวัดสุรินทร์ที่อำเภอเมือง ปราสาท และ สังขะ จังหวัดอุบลราชธานีที่อำเภอเมือง วารินชำราบ พิบูลย์มังสาหาร นาจรวย น้ำยืน บุณฑริก เดชอุดม และโขงเจียม

ภาคกลาง : จังหวัดสุโขทัยที่อำเภอเมืองศรีนคร และศรีสำโรง จังหวัดพิษณุโลกที่อำเภอเมือง ชาติตระการ พรหมพิราม และวังทอง จังหวัดเพชรบูรณ์ที่อำเภอเมืองชนแดน เขาค้อ หล่มสัก และวิเชียรบุรี จังหวัดนครสวรรค์ที่อำเภอตากฟ้า และตาคลี จังหวัดอุทัยธานีที่อำเภอเมือง หนองฉาง บ้านไร่ และลานสัก จังหวัดอ่างทองที่อำเภอเมือง และ สามโก้ จังหวัดสุพรรณบุรีที่อำเภอเมือง ด่านช้าง และอู่ทอง จังหวัดนครปฐมที่อำเภอเมือง และกำแพงแสน จังหวัดสมุทรสงคราม อำเภอเมือง บางคนที และอัมพวา

ภาคตะวันออก : จังหวัดปราจีนบุรี ที่อำเภอเมือง ประจันตคาม และกบินทร์บุรี จังหวัดสระแก้วที่อำเภอเมือง และวังน้ำเย็น จังหวัดฉะเชิงเทราที่อำเภอเมือง พนมสารคาม และเขาหินซ้อน จังหวัดชลบุรีที่อำเภอบางละมุง และศรีราชา จังหวัดระยอง ที่อำเภอเมือง แกลง และวังจันทร์ จังหวัดจันทบุรีที่อำเภอเมือง นายายอาม แก่งหางแมว สอยดาว และท่าใหม่ จังหวัดตราดที่อำเภอเมือง และเขาสมิง

ภาคใต้ : จังหวัดสุราษฎร์ธานีที่อำเภอเมือง พุนพิน และไชยา จังหวัดระนองที่อำเภอเมือง กระบุรี และ กะเปอร์ จังหวัดพังงาที่อำเภอตะกั่วป่า คุระบุรีและท้ายเหมือง และจังหวัดภูเก็ตที่อำเภอเมือง กะทู้ และถลาง

วิธีการสำรวจใช้วิธีเดินสำรวจเป็นแนวเส้นทแยงของพื้นที่สำรวจ ซึ่งได้แก่แปลงพืชไร่ พืชผัก และพืชสวนเช่นสวนส้มโอ และสวนลิ้นจี่ และพืชอุตสาหกรรม เช่น ยางพารา และปาล์มน้ำมัน หรือตามแถวริมถนน หรือบริเวณรอบนอกของสวนป่า เมื่อพบพืชสกุล *Conyza* ก็จะตรวจดูลักษณะของขนที่ใบประดับของดอกย่อย ซึ่งจะเป็นลักษณะเด่นที่ใช้แยก ชนิด/พันธุ์ (species) ระหว่าง *C. sumatrensis* กับ *C.canadensis* และบันทึกลักษณะของต้น ใบ พร้อมทั้งบันทึกสถานที่และสภาพแวดล้อมของพื้นที่สำรวจ เก็บตัวอย่างเพื่อจัดทำพรรณไม้แห้ง รวมถึงเมล็ดที่แก่และสมบูรณ์

เวลาและสถานที่

เริ่มดำเนินงานตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2552 ในพื้นที่ทำการเกษตรและไม่ได้ทำการเกษตร บริเวณข้างทางและสวนป่า

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

พืชสกุล *Conyza* จัดอยู่ในวงศ์ (family) Asteraceae ลักษณะของพืชในสกุลนี้คือ เป็นพืชอายุปีเดียวหรือหลายปีหรือเป็นไม้พุ่ม **ใบ** เรียงแบบสลับ (alternate) ขอบใบเรียบ หรือจักคล้ายซี่ฟัน (toothed) หรือขอบใบเว้าลึกเข้าหาเส้นกลางใบในลักษณะเดียวกับใบประกอบแบบขนนก (pinnalifid) ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อยเป็นกระจุกมีดอกย่อยมากกว่า 1 ชนิด (Capitula heterogamous) ชั้นของริ้วประดับ (Phyllarics) มีหลายชั้น ลักษณะเรียวยาวรูปใบหอก หรือรูปคล้ายสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีด้านยาว ยาวมากกว่ากว้าง ใบประดับชั้นนอกมีขนาดเล็กกว่าใบประดับชั้นใน ดอกย่อยรอบนอกเป็นดอกตัวผู้ สีขาว/เขียว/เหลือง มีหลายชั้น รูปร่างเป็นเส้น หรือปลายกว้างโคนแคบ ดอกย่อยรอบในหรือตรงกลางช่อเป็นดอกสมบูรณ์เพศ สีเหลืองอ่อน/เขียว/ขาว แต่มักจะเป็นหมัน มีกลีบดอกเป็นรูปสามเหลี่ยม กลีบดอกชั้นนอกที่เพิ่มขึ้นจะมีลักษณะเป็นขนเส้นยาวและอ่อน พืชในสกุลนี้มี 60 พันธุ์ (species) เจริญเติบโตได้ดีในเขตอบอุ่นและเขตร้อน (http://plantnet,rbgsyd.nsw.gov.au/cgi_bin/NSWf/.p/?IVI=gn&name=Conyza)

Key to the genus *Conyza*

1. **Involucral bracts densly hair** ……2
2. Leaves linear, oblong or narrow-oblanceolate ; the whole plant appearing pale grey from the spread septate hairs especially dense on the stems and around the axis ….*C.bonariensis*

2 * Leaves lanceolate, oblanceolate or spathulate ; plants hispid with short septate or glandular hairs, giving a yellowish green appearance …….3

3 Growth from widely branching below the diffuse inflorencence ; stems and leaves with dense yellow glandular hairs, as well as hispid hairs on the leaves ….*C. leucantha*

3 * Growth form mainly a simple unbranched below a distinct inflorescence; stems and leaves hispid with septale hairs ……4

4 Inflorescence of up to 7 heads; involucre darker Than the florets, heads 8-12 mm. long. 15-20 mm. diam ….*C.primulifolia*

4 * Inflorescence of many heads ; involucre pale, the

same colour as the florets; heads 4-5 mm. long 3-4 mm. diam ....***C.sumatrensis***

1. **Involucral bracts glabrous or almost so** 5

5. Heads campanulate, outer florets with short, but visible, white ligules, involucral bracts pale cream on the innersurface 6

6 Stems conspicuously but not densely hairy with long, spreading septate hairs, leaf margins usually more or less toothed, flat, involucral bracts without an apical red spot .....***C.canadensis***

6 * Stem not conspicuously hairy, leaf margins entire or crenulate, recurves; involucral bracts usually with an apical red dot .....*C.parva*

5 * Heads hemispherical; outer florets filiform, involucral bracts orange or reddish on the inner surface, glabrous, without an apical red spot .....*C.bilbaoana*

(htt://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi_bin/NSWfl.pl?page=nswfl&name=Conyza)

Compiled and edited by staff of the National Herbarium of New South Wales. 1999-2010 Royal Botanic Gardens & Domain Trust, Sydney Australia

จากตารางกุญแจเพื่อจำแนกพันธุ์ (species) ของสกุล *Conyza* จะเห็นข้อแตกต่างอย่างเด่นชัดของ *C. sumatrensis* กับ *C. canadensis* ในข้อ 1 และ 1 * คือ ใบประดับของ *C. sumatrensis* มีขนปกคลุมหนาแน่น ส่วนใบประดับของ *C. canadensis* จะเกลี้ยง (ไม่มีขน) หรือเกือบเกลี้ยง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของ *C. sumatrensis* และ *C.canadensis*

ชื่อวิทยาศาสตร์ *C. sumatrensis* (Retz.) Walker

Syn. *C.albida* Willd. ex Spreng

C.floribunda Kunth

Erigeron floribundes (Kunth.) Sch. Bip.

C.alissima

C.nandia

ชื่อสามัญ fleabane, tall fleabane, broad-leaved fleabane, white horse weed, sumatran fleabane, guernsry fleabane

ชื่อไทย จ้อล่อ

ถิ่นกำเนิด อเมริกาใต้

พืชอายุปีเดียว **ต้น**สูง 1-2 เมตร ปกคลุมด้วยขน ไม่แตกกิ่งก้าน หรือแตกกิ่งเมื่อมีช่อดอก **ใบ** เป็นใบเดี่ยวติดแบบสลับ ปกคลุมด้วยขนทั้งสองด้าน **ใบ**ช่วงล่างของลำต้นรูปใบหอกเรียวยาว หรือ รูปใบหอกแต่กลับเอาด้านกว้างขึ้นยาว 4-10 ซม. กว้าง 5-12 มม. ขอบใบจักคล้ายซี่ฟัน **ใบ**ช่วงบนของลำต้นรูปใบหอกเรียวยาว ขอบใบเรียบ **ช่อดอก** แตกกิ่งมากประกอบด้วยดอกย่อยแบบกระจุกแน่น **ดอกย่อย**ไม่มีก้านดอก ยาว 4-6 มม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-10 มม. **ใบประดับ**มีขนปกคลุมหนาแน่น สีเขียวอ่อน ขอบเรียบ ผิวด้านในสีน้ำตาลแดง **ดอกย่อย**รอบนอกสีขาวหรือสีครีม รูปร่างเป็นเส้นเรียว **ดอกย่อย**รอบในมีจำนวนน้อยกว่า สีเหลืองอ่อน **ผล**แบบที่มีเปลือกบางแห้ง และเหนียว แต่เปลือกไม่หลอมรวมกับเปลือกของเมล็ด เมื่อแก่เปลือกไม่แตก มีเมล็ด 1 เมล็ด มักเรียกผลว่าเมล็ด รูปทรงกลมรี มีขนยาวเป็นกระจุกที่ด้านปลายเมล็ด

(http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi_bin/NSWflpl?page-nswfl&lvl=sp&name=Conyza-sumatrensis)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *C.canadensis* (L.) Cronq.

Syn. *Erigeron canadensis* (L.) Cronq.

Leptilon canadensis

ชื่อสามัญ horse weed, Canadian horse weed< Canadian fleabane, coltstail, marestail, butter weed

ชื่อไทย -

ถิ่นกำเนิด อเมริกาเหนือ และอเมริกากลาง

พืชอายุปีเดียว **ต้น**ตั้งตรง สูง 50-200 ซม. ไม่แตกกิ่ง ยกเว้นส่วนปลายแตกกิ่งเพื่อออกดอก ปกคลุมด้วยขนยาว **ใบ**เดี่ยว เรียง ติดกับต้นแบบสลับ **ใบ**ที่อยู่ช่วงล่างของลำต้นรูปใบหอกหรือใบหอกหัวกลับ เรียวยาว ขอบใบจักเป็นซี่ฟัน มีขนอ่อนปกคลุมใบทั้งสองด้าน **ใบ**ช่วงบน หรือบริเวณช่อดอกมีขนาดเล็กรูปเรียวยาว ขอบใบเรียบแตกกิ่งมาก ประกอบด้วยดอกย่อยแบบกระจุกแน่น **ดอกย่อย**ไม่มีก้านดอก มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1/8 นิ้ว ใบประดับเกลี้ยง หรือมีขนอ่อนบาง ๆ ดอกย่อยที่เรียงตรงกลางดอกสีขาว/ชมพูอ่อน ดอกย่อยรอบนอกสีขาว/ชมพูอ่อน **ผล**แบบที่มีเปลือกบางแห้งและเหนียว แต่เปลือกมิได้หลอมรวมกับเปลือกหุ้มเมล็ด เมื่อแก่เปลือกไม่แตกมี 1 เมล็ดมักเรียกผลว่าเมล็ดรูปทรงกลมรีมีขนยาวเป็นกระจุกที่ปลายเมล็ด

(http://www.col.org/pages/467659)

เมื่อได้ศึกษาลักษณะของพืชในสกุล *Conyza* ทั้ง 2 พันธุ์ (Species) ตามรายละเอียดข้างต้นแล้ว ได้ออกสำรวจการปรากฏหรือไม่ปรากฏของ *Conyza* ทั้ง 2 พันธุ์/ชนิด พื้นที่สำรวจได้

แบ่งออกเป็น 6 ภาค ตามที่กำหนดในแผนงานวิจัย โดยสำรวจทั้งในแปลงปลูกพืชไร่ พืชผัก สวนไม้ผล และพืชอุตสาหกรรม ลักษณะทางภูมิศาสตร์ของพื้นที่สำรวจมีทั้งความสูงระดับน้ำทะเล กับพื้นที่ที่ ระสูงกว่าระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,000 เมตร

ในประเทศไทยมีรายงานการแพร่กระจายของพืชในสกุล*Conyz*a 2 ชนิดคือ *C.sumaternsis* (Retz.) Walker ซึ่งพบทั่วทุกภาคของประเทศไทยที่ระดับสูงจากน้ำทะเล 100 -1,000 เมตร (Harada et al.,1987) ส่วน *Conyza* อีกชนิดคือ *C.stricta* Willd.var.stricta แพร่กระจายที่ภาคตะวันออกของทวีปอาฟริกา ทางด้านเหนือของประเทศประเทศอินเดีย ถึงทางใต้ของประเทศจีน และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยพบในไร่ถั่วเหลือง ทางภาคเหนือ (Radanachales and J.F., 1994)

การสำรวจและติดตามการแพร่กระจายของ *C.canadensis* (L.) Cronq. นั้น คณะทำงานได้ศึกษาลักษณะเด่นที่เป็นข้อแตกต่างระหว่าง *C.canadensis* (L.) Cronq. กับ*C. sumatrensis* (Retz.) Walker ตามข้อความที่ปรากฏในกุญแจการจำแนกชนิดของพืชในสกุล *Conyza* ผลจากการสำรวจนั้น พบ *Conyza* เพียงชนิดเดียวคือ *C. sumatrensis* (Retz.) Walker แต่**ไม่พบ** ***C.canadensis*** (L.) Cronq.

การแพร่กระจาย*ของจ้อล่อ* (***Conyza sumatrensis*** (Retz.) Walker)

ภาคเหนือ พบจ้อล่อในพื้นที่ปลูกพืชไร่ต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง มันฝรั่งและพืชผัก นอกจากนี้ ตามสวนผลไม้ เช่นสวนส้มโอ และลิ้นจี่ กับบริเวณรอบนอกของส่วนป่า ริมถนนและบริเวณที่ว่างของบ้านพักอาศัย รวมถึงพื้นที่รกร้างที่ไม่ได้ทำการเกษตร พบจ้อล่อทุกจังหวัดที่สำรวจ

ภาคตะวันตก พบจ้อล่อในลักษณะเดียวกับทางภาคเหนือ และพบที่จังหวัดตาก ในแปลงปลูกมันฝรั่ง และแปลงปลูกไม้ดอกต่างๆ ตามริมถนนและที่รกร้างไม่ได้ทำการเกษตร ส่วนที่จังหวัดกาญจนบุรี พบจ้อล่อปริมาณเล็กน้อย และส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณรอบที่พักอาศัย ซึ่งอาจแพร่กระจายมาตามธรรมชาติ คือปลิวมากับลม เนื่องจากเมล็ดจ้อล่อนอกจากมีขนาดเล็กแล้วยังมีกระจุกขนที่ปลายด้านหนึ่งของเมล็ด ช่วยทำให้ปลิวไปได้ไกล นอกจากนี้ยังอาจติดมากับยานพาหนะ วัสดุที่ใช้ทางการการเกษตรต่างๆ คน สัตว์ ดิน หรือผลผลิตการเกษตรต่างๆ เป็นต้น ส่วนที่จังหวัดราชบุรีและประจวบคีรีขันธ์ไม่พบจ้อล่อในพื้นที่ที่สุ่มตรวจ

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบจ้อล่อค่อนข้างมาก โดยเฉพาะแนวริมถนนเลียบแม่น้ำโขงจากจังหวัดเลยไปจังหวัดหนองคาย บริเวณบ้านพักอาศัยของเกษตรกร และที่รกร้าง ส่วนจังหวัดอื่นๆพบจ้อล่อแพร่กระจายเล็กน้อยตามริมถนน และชายป่า

ภาคกลาง พบจ้อล่อแพร่กระจายค่อนข้างมากในพื้นที่ทำการเกษตรที่อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ และพบเล็กน้อยตามริมถนน และพื้นที่ไม่ได้ทำการเกษตร ที่จังหวัดสุโขทัย พิษณุโลก และอุทัยธานี ส่วนจังหวัดนอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว ไม่พบจ้อล่อ

ภาคตะวันออก พบจ้อล่อแพร่กระจายมากในสวนยางพาราที่อำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรีและพบปริมาณเล็กน้อยในสวนยางพาราที่จังหวัดฉะเชิงเทรา ส่วนจังหวัดอื่นๆไม่พบจ้อล่อในแปลงที่สุ่มสำรวจ

ภาคใต้ พบจ้อล่อแพร่กระจายมากในสวนยางพารา และสวนสมุนไพรที่อำเภอเมือง และถลาง จังหวัดภูเก็ต และพบปริมาณเล็กน้อยในสวนยางพาราที่อำเภอเมือง จังหวัดระนอง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจเพื่อบันทึกข้อมูลการปรากฏหรือไม่ปรากฏของ *C.canadensis* (L.)Cronq. โดยการสุ่มตรวจพื้นที่ทั้งที่ทำการเกษตร และไม่ได้ทำการเกษตร ในพื้นที่ที่มีลักษณะทางภูมิศาสตร์ต่างๆ คือพื้นที่ที่มีความสูงระดับน้ำทะเล และพื้นที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเลมากกว่า 1,000เมตร ผลของการศึกษา ไม่พบการปรากฏของ ***C.canadensis*** **(L.)Cronq.** ตามภาคต่างๆทั้ง 6ภาค ของประเทศไทย ส่วนใหญ่จะพบการแพร่กระจายของ *C. sumatrensis* (Retz.) Walker ทั้งในพื้นที่ทำการเกษตร และไม่ได้ทำการเกษตร และบริเวณรอบนอกของสวนป่า ระดับความสูงของพื้นที่ที่พบตั้งแต่ความสูงระดับน้ำทะเล จนถึงความสูงมากกว่า 1,000 เมตร

เอกสารอ้างอิง

1. นิรนาม,2006. ISPM No.5 (รายการคำอธิบายศัพท์บัญญัติด้านสุขอนามัยพืช). สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. กรุงเทพมหานคร , 10900. 195หน้า
2. Anonymous, 1982. Weed Surveying Technique. Paper in ASEAN Planti Advance Course on Weed Identification. 6-25 June 1982. ASEAN PLANTI Quarantine Centre and Training Institute, Malaysia. 20 pp.
3. Harada, J., Y. Paisooksantivatana and S. Zungsontiporn. 1987.Weeds in the Highland of Northern Thailand : color illustrated . Botany and Science Division , Department of Agriculture. Mass & Media Co.Ltd., Bangkok.126 pp.
4. htt://www.plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&name=Conyza
5. htt://www.plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi- bin/NSWfl.pl?page=nswfl&lvl=gn&name= (Conyza)
6. htt://www.plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/cgi- bin/NSWfl.pl?page-nswfl&lvl=sp&name= =Conyza sumatrensis

7. htt://www.col.org/pages/467659

8. htt://www.thaihomaster.com/showinformation.php ?TYPE-I&ID=464

9. htt://www.zibabwelfora.co.zw/speciesdata/genus.php ?

10. R.Tavatchai and J.F.Maxwell.1994.Weeds of Soybean Fields in THAILAND.Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand.408pp.

การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของ *Euphorbia dentata* และ *Agrostis spp.* ในพืชไร่

The Distribution Surveillance of *Euphorbia dentata* and *Agrostis spp.* In Field Crops

คมสัน นครศรี จรัญญา ปิ่นสุภา
กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การสำรวจวัชพืช *Euphorbia dentata* Michx. และ *Agrostis spp.* ในพืชไร่ โดยใช้วิธีการแบบ subjective sampling เพื่อเป็นการสำรวจหาข้อเท็จจริง (Exploration research) เกี่ยวกับการแพร่ระบาดของวัชพืชทั้ง 2 ชนิดในพื้นที่ที่กำหนด ในเขตอำเภอของจังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ ศรีสะเกษ หนองคาย นครพนม สกลนคร กาฬสินธุ์ นครนายก สระบุรี ลพบุรี และชัยนาท ผลการสำรวจไม่พบวัชพืชทั้ง 2 ชนิดในพื้นที่ที่กำหนด แต่พบวัชพืชอื่น ๆ ขึ้นในแปลงปลูกพืชที่ทำการสำรวจ จึงเห็นว่าควรขยายพื้นที่การสำรวจให้มากขึ้นทั้งภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและใต้ทั้งหมด

รหัสการทดลอง 07-01-51-01-03-01-03-51

คำนำ

ในอดีตที่ผ่านมามีการนำเข้าพืชเพื่อประโยชน์อย่างใดอย่างหนึ่ง และกลายเป็นวัชพืชร้ายแรงมากมาย ธูปฤาษี (*Typha. angustifolia*) นำเข้ามาเป็นไม้ประดับริมน้ำ และดอกใช้จัดดอกไม้ ปัจจุบันระบาดทั่วไปในแหล่งน้ำที่มีน้ำท่วมขังไม่ลึกนัก จนถึงที่ดินชื้นจัดริมน้ำ ตาลหม่อน (*Vernonia eclipta* DC) เป็นไม้เลื้อยในวงศ์ทานตะวัน นำเข้ามาเป็นไม้ประดับ สร้างดอกจำนวนมาก เมล็ดมีขนาดเล็ก มีขนเล็กๆ ช่วยในการปลิวไปตามลม ปัจจุบันพบเป็นวัชพืชในแถบภาคตะวันออก เช่น จังหวัดระยอง หญ้าขจรจบดอกใหญ่ (*Pennisetum pedicellatum* Trin.) หญ้าขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum polystachyon* (L.) Schult.) นำเข้ามาเป็นอาหารสัตว์ในปี 2498 จากประเทศอินเดีย (ฤกษ์,2530) หญ้าพง (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) นำเข้ามาเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ หญ้าหางนกยูงใหญ่ (*Acrachne racemosa* (Roemer & J.A. Schultes) Ohwi หรือ *Eleusine racemosa* Roemer & J.A. Schultes) เพิ่งพบระบาดในบางท้องที่ของจังหวัดกาญจนบุรี แต่ในช่วง 4-5 ปีที่ผ่านมามีการระบาดมากในพื้นที่ปลูกพืชไร่หลายชนิด เช่น ข้าวโพด ฝ้าย พืชผัก ไม้ดอก ฯลฯ ในพื้นที่หลายจังหวัด เช่น กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม นครสวรรค์ สระบุรี ลพบุรี อุทัยธานี เชียงราย เป็นต้น และมีแนวโน้มจะระบาดมากขึ้น ก้นจ้ำขาวดอกใหญ่ (*Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff) เป็นพืชอายุสั้น 2-3 ปี มีถิ่นกำเนิดในอเมริกากลาง นำเข้าจากไต้หวันเพื่อใช้เลี้ยงผึ้ง เมื่อประมาณปี 2541-2542 เนื่องจากพืชนี้สามารถออกดอกตลอดปี เจริญเติบโตได้รวดเร็ว และพืชชนิดนี้มีดอกสวยงาม สร้างเมล็ดจำนวนมาก เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูง ปัจจุบันพบกระจายทั่วไปในภาคเหนือ และหลายจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศิริพร และคณะ, 2546) การปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์ เช่น หญ้ายาง ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของแอฟริกา คาดว่าปะปนเข้ามากับเมล็ดข้าวโพด มากกว่า 40 ปีมาแล้ว (Teerawatsakul, 1986) กลายเป็นวัชพืชร้ายแรงสำหรับพืชไร่ และพืชอื่นๆ อีกมากมาย วัชพืช *Euphorbia dentata* Michx. มีรายงานว่ามีการสุ่มตรวจพบในตัวอย่างข้าวที่ส่งออกไปยังประเทศจีน ขณะที่ *Agrostis spp.* สุ่มตรวจพบในตัวอย่างปลายข้าวที่ส่งออกไปยังประเทศออสเตรเลีย ดังนั้น เพื่อให้ได้ข้อมูลของวัชพืชทั้ง 2 ชนิด จึงต้องเฝ้าระวังการแพร่ระบาด โดยการสำรวจในพื้นที่ปลูกพืชไร่ เพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นได้กับพืชปลูก ซึ่งจะมีผลต่อเงื่อนไขทางการค้าในอนาคตของประเทศได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์ประกอบการสำรวจ

1. รูปภาพของวัชพืชทั้ง 2 ชนิด
2. ถุงกระดาษและถุงพลาสติก

3. ปากกาและดินสอ

4. เชือก

วิธีการ

วางแผนการสำรวจโดยใช้วิธีการแบบ Subjective sampling เป็นการสำรวจหาข้อเท็จจริง (Exploration research) เกี่ยวกับการแพร่ระบาดของวัชพืชทั้ง 2 ชนิดในพื้นที่ที่กำหนด และใช้รูปภาพวัชพืชประกอบในการสำรวจและสอบถามเกษตรกรในพื้นที่สำรวจ นอกจากนั้นยังสำรวจวัชพืชอื่นๆ ที่พบในพื้นที่การสำรวจด้วย

เวลาและสถานที่

ทำการสำรวจในระหว่างเดือน ตุลาคม 51-กันยายน 2552 ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ ศรีสะเกษ อุบลราชธานี สกลนคร กาฬสินธุ์ และหนองคาย และภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดสระบุรี ลพบุรี ชัยนาท และนครนายก

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสืบค้นข้อมูลของวัชพืชทั้ง 2 ชนิด นั้น *Euphorbia dentate* Michx. จัดอยู่ใน Family *Euphorbiaceae* มีสามัญว่า toothed spurge หรือ green poinsettia เป็นพืชพื้นเมืองของทวีปอเมริกาเหนือและทวีปอเมริกาใต้ ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกามีการแพร่กระจายตั้งแต่มลรัฐ Massachusetts ถึงมลรัฐ Virginia และจากตะวันตกของประเทศถึงมลรัฐ Arizona แต่เป็นวัชพืชร้ายแรง(noxious weed) ในบางพื้นที่โดยเฉพาะในมลรัฐ Idaho(Callihan and Miller,2009) วัชพืช toothed spurge เป็นพืชฤดูเดียว(annual) มีความสูงถึง 90 เซนติเมตร ใบยาว 7.6 เซนติเมตร ใบออกเป็นคู่อยู่ตรงกันข้าม รูปร่างของใบเป็นแบบกลมรี ปลายใบแหลมจนถึงใบออกเรียวยาว (ovate to linear) ขอบใบเป็นฟันปลา ใบและก้านใบมีขน และบางต้นมีจุดสีม่วงแดง 2-3 จุดที่ผิวใบด้านบน ลำต้นมีแขนงออกเป็นคู่อยู่ตรงกันข้ามซึ่งจะชี้ทแยงขึ้นด้านบน ลำต้นมีขน ทั้งลำต้นและใบเมื่อแตกหักจะมีน้ำ ลักษณะสีขาวข้นไหลออกมา ออกดอกในราวเดือน กรกฎาคม ถึง สิงหาคม ดอกออกที่ปลายมี 3 พู คล้ายผ้าโพกศีรษะขนาด 0.6 เซนติเมตร ผลสีเขียว เมล็ดรูปไข่ขรุขระเป็นหลุม สีเทา

สำหรับสกุล *Agrostis* เป็นวัชพืชพืชป่า จำพวกหญ้า ประกอบด้วยวัชพืชประมาณ 220 ชนิด(species) อยู่ใน Family Poaceae พบที่ประเทศกรีก (Watson and Dallwitz, 1992) จัดเป็นวัชพืชประเภทฤดูเดียว (annual) หรืออายุข้ามปี (perennial) มีหัวหรือมีเหง้าใต้ดิน ลำต้นเหนือดินแผ่ติดกัน นอนราบไปกับพื้นดิน ใบแหลมเรียวแต่ในบางชนิดใบจะอ้วน ช่อดอกแบบ Spikelets ส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์ในการทำสนามหญ้า สนามกอล์ฟ สวน และอาหารสัตว์ แต่มีบางชนิด

สามารถนำใช้ประโยชน์ในการป้องกันการกัดเซาะของดินได้ (Vergara and Bughrara, 2003) สำหรับ ***Agrostis*** *stolonifera* หรือบางครั้งเรียก *Agrostis palustris* มีชื่อสามัญว่า creeping bent เป็นหญ้าในเขตหนาวของทวีปยุโรป นำเข้ามาในประเทศสหรัฐอเมริกาในช่วงยุคอาณานิคม เพื่อใช้ในการทำสนามกอล์ฟ แต่ถ้าเป็น *Agrostis gigantea* Roth. มีชื่อสามัญว่า redtop, red top bent หรือ meadow redtop พบในเขตอบอุ่นของทวีปเอเชีย และในเขตร้อนพบในอินเดีย (Anonymous,2009) redtop เป็นพืชพื้นเมืองของทวีปยุโรปและนำเข้าประเทศสหรัฐอเมริกาเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ (Carey,2009) ส่วนในออสเตรเลียพบ 36 ชนิด มี 3 ชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์คือ *A. capillaris* (brown-top bent), *A. stolonifera* (creeping bent) and *A. gigantea* (red-top bent) ทำสนามหญ้า แต่อย่างไรก็ตามวัชพืชเหล่านี้จะเป็นปัญหากับพืชอาหารสัตว์และพืชปลูก (Brown and James,1998)

การสำรวจในเขตพื้นที่ที่กำหนดได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา(อำเภอ ปากช่อง สีคิ้ว ปักธงชัย วังน้ำเขียว และครบุรี) สุรินทร์(อำเภอสำโรงทาบ ศีขรภูมิ ท่าตูม ลำดวน สังขะ และ รัตนบุรี) จังหวัดศรีสะเกษ(อำเภอขุขันธ์ ภูสิงห์ กันทรลักษ์ กันทรารมย์ วังหิน พยุห์ น้ำเกลี้ยง ศรีรัตนะ เบญจลักษ์ และ โนนคูน) จังหวัดหนองคาย(อำเภอโพนพิสัย เฝ้าไร่ รัตนวาปี ศรีวิไล และ พรเจริญ) จังหวัดสกลนคร(อำเภอคำตากล้า อากาศอำนวย ภูพาน และอำเภอเมือง) จังหวัดนครพนม(อำเภอนาทม ศรีสงคราม นาหว้า และโพนสวรรค์) จังหวัดกาฬสินธุ์(ห้วยผึ้ง สมเด็จ เมือง และยางตลาด) จังหวัดสระบุรี(อำเภอหนองโดน บ้านหมอ พระพุทธบาท และอำเภอดอนพุด) จังหวัดลพบุรี(พัฒนานิคม โคกสำโรง ชัยบาดาล ท่าวุ้ง และท่าหลวง) จังหวัดชัยนาท(อำเภอเมือง วัดสิงห์ สรรคบุรี และสรรพยา) และจังหวัดนครนายก(อำเภอเมือง องครักษ์ และบ้านนา) ในแปลงปลูกมันสำปะหลัง ข้าวโพด นาข้าว พริก มะเขือเปราะ มะเขือเทศ และอ้อย พบว่า การสำรวจไม่พบวัชพืชทั้ง 2 ชนิด คือ *Euphorbia dentata* and *Agrostis spp.* แต่พบวัชพืชอื่นๆ เช่น หญ้าข้าวนก (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.) หญ้านกสีชมพู (*E.colonum* (L.) Link. หญ้าดอกขาว (*Leptochloa chinensis* (L.) Nees หญ้าชันกาด (*Penicum repens* L.) หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) หญ้าตีนนก (D*igitaria ciliaris* (Retz.) Koel.) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* (L.) Beauv.) หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) หญ้ารังนก (*Chloris barbata* Sw.) กะเม็ง (*Eclipta prostrata* L.) หญ้าแดง (*Ischaemum rugosum* Salisb.) ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens* L.) ตดหมูตดหมา (*Paederia linearis* Hook.f.) ถั่วผี (*Phaseolus lathyroides* L.) เทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G.Don) Exell) โทงเทง (*Physalis minima* L.) น้ำนมราชสีห์ (*Euphorbia hirta* L.) บานไม่รู้โรยป่า (*Gomphrena celosiodes* Mart.) ปอวัชพืช (*Corchorus olitorius* L.) ผักโขม (*Amaranthus viridis* L.) ผักโขมหนาม (*A. spinosus* L.) ผักโขมหิน (*Boerhavia diffusa* L.) ผักเบี้ยหิน (*Trianthema*

portulacastrum L.) ผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea* L.) ผักปลาบ(*Commelina benghalensis* L.) ผักเสี้ยนผี(*Cleome visc*osa L.) แมงลักป่า (*Hyptis suaveolens* (L.) Poit.) ไมยราบ (*Mimosa pudica* L.) สาบเสือ (*Chromolaena odoratum* (L.) King&Rob.) เส้งใบมน (*Melochia corchorifolia* L.) หญ้างวงช้าง (*Heliotropium indicum* L.) หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) หญ้าละออง (*Vernonia cinerea* (L.) Less.) กกขนาก(Cyperus difformis L.) กกทราย (*Cyperus iria* L.) และ หญ้าแห้วหมู (*cypreus rotundus* L.)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจวัชพืช *Euphorbia dentata* Michx. และ *Agrostis spp.* ในพืชไร่ ในพื้นที่ที่กำหนด คือ ในเขตอำเภอของจังหวัดนครราชสีมา สุรินทร์ ศรีสะเกษ หนองคาย นครพนม สกลนคร กาฬสินธุ์ นครนายก สระบุรี ลพบุรี และชัยนาท ผลการสำรวจไม่พบวัชพืชทั้ง 2 ชนิดในพื้นที่ที่กำหนด แต่พบวัชพืชอื่น ๆ ขึ้นในแปลงปลูกพืชที่ทำการสำรวจ จึงเห็นว่าควรขยายพื้นที่การสำรวจให้มากขึ้นทั้งภาคกลาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและใต้ทั้งหมด

เอกสารอ้างอิง

ศิริพร ซึงสนธิพร วินัย สมประสงค์ ปราโมทย์ ไตรบุญ. 2546. ก้นจ้ำขาวดอกใหญ่ วัชพืชชนิดใหม่ของไทย. *ใน* การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 6. จังหวัดขอนแก่น 24-27 พฤศจิกายน 2546.

ฤกษ์ ศยามานนท์. 2530. หญ้าขจรจบในประเทศไทย.หน้า 11-15.*ใน* : รายงานการประชุมทางวิชาการ เรื่อง หญ้าขจรจบดอกเหลือง. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ณ โรงแรมสยามธานี จังหวัดสุราษฎร์ธานี 23-24 พฤศจิกายน.

Anonymous.2009. *Agrostis gigantea* Roth. . [Online] Available at http://www.ars-grin.gov/cgi- bin/npgs/html/taxon.pl?2027 [2009 April 16]

Brown, A.J. and E.A. James. 1998. Biodiversity and potential utilization of blown-grasses (*Agrostis spp*.) in Lowland Victoria. . [Online] Available at http://www.regional.org.au/au/asa/1998/1/049brown.htm [2009 April 16]

Callihan,R.H. and T.W.Miller.2009. Idaho's Noxious Weeds. [Online] Available at http://www.oneplan.org/Crop/noxWeeds/nxWeed33.asp. [2009 April 12]

Carey, J.H. 2009. *Agrostis gigantea* Roth. [Online] Available at http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/graminoid/agrgig/all.html [2009 April 12]

Paul L. Redfearn, Jr..2009. [Online] Available at

http://biology.missouristate.edu/Herbarium/Plants%20of%20the%20Interior%20Highlands/photographs_of_flowering_plants_E.htm [2010 April 7]

Teerawatsakul, M. 1986. Ecophysiological studies of *Euphorbia geniculata* Ort. and its control in corn. *In* Project report no.4 Highlights of Technical copperation 1980- 1985. National Weed Science Research Institute Project by Japan International Cooperation Agency and Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Thailand. pp 15-132.

Vergara G. V. and Bughrara S. S.. 2003. AFLP Analyses of Genetic Diversity in Bentgrass. Crop Sci. 43: 2162-2171.

Watson L.and M.J. Dallwitz. 1992. Grass genera of the world. [Online] Available at http://delta-intkey.com/grass/www/agrotis.html [2010 April 7]

http://species.wikimedia.org/wiki/Agrostis [2010 April 7]

http://luirig.altervista.org/flora/agrostis.htm [2010 April 7]

http://www.missouriplants.com/Others/Euphorbia_dentata_page.html [2010 April 27]

http://extension.missouri.edu/publications/DisplayPub.aspx?P=IPM1023-23 [2010 April 27]

ภาพที่ 1 ต้น toothed spurge

ภาพที่ 2 ลำต้นและก้านใบมีขน

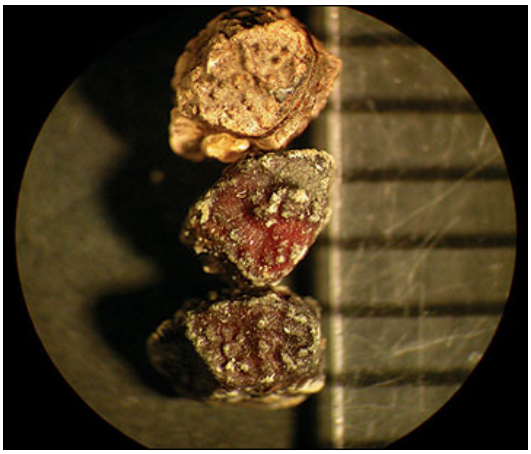
ภาพที่ 3 ใบออกกลมรีปลายใบแหลมขอบใบมีลักษณะฟันปลา

ภาพที่ 4 ใบออกเรียวยาว บางใบมีจุดสีม่วง

ภาพที่ 1 และ 4 ที่มา : (Paul L. Redfearn, Jr., 2009)

ภาพที่ 5 ช่อดอกออกที่ปลายกิ่ง 3 พู

ภาพที่ 6 ผลเป็น capsule มี 3 เมล็ด



ภาพที่ 7 เมล็ดของ toothed spurge

ภาพที่ 2, 3, 5 และ 6 ที่มา : http://www.missouriplants.com/Others/Euphorbia_dentata_page.html

ภาพที่ 7 **ที่มา**: :

http://extension.missouri.edu/publications/DisplayPub.aspx?P=IPM1023-23

Agrostis gigantea Roth.

Agrostis capillaris

Agrostis *stolonifera*

ภาพที่ 2 สกุล *Agrostis* บางชนิด

ที่มา : http://species.wikimedia.org/wiki/Agrostis

http://luirig.altervista.org/flora/agrostis.htm

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรม รา *Fusarium* spp.ในประเทศไทย

DNA Fingerprint and Genetic Variation of *Fusarium* spp. In Thailand

ธารทิพย ภาสบุตร อภิรัชต์ สมฤทธิ์ สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ นภสร ปุญญพิทักษ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยเทคนิค AFLP พบว่าสามารถแบ่งการกระจายตัวทางพันธุกรรมของเชื้อได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย 13 สายพันธุ์ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ และรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของปอเทือง จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวและใบไหม้ของกล้วยไม้และวานิลาจากแหล่งปลูกภาคกลาง 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเปราะ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 5 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 6 สายพันธุ์ และจากแหล่งปลูกทางภาคกลาง 1 สายพันธุ์ ส่วนการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RAPD ไม่สามารถสรุปผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* แต่ละไอโซเลทที่นำมาทดลองได้ เนื่องจากพบว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ PFE08 และ PFE12 ไม่แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ที่นำมาทดลอง

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-01-01-08-50

คำนำ

รา *Fusarium* spp. จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina form – class Hyphomycetes form – order Tuberculariales form - family Tuberculariaceae (Ainsworth, 1973) *Fusarium* spp. เป็นราสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญ เป็นสาเหตุโรคของพืชมากมายหลายชนิด อาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง *Fusarium* เป็นราที่อาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง หลายชนิด (species) เป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น โรคถอดฝักดาบของข้าว โรคตายพรายของกล้วย โรคเหี่ยวของพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ โรครากเน่าของพืชตระกูลถั่ว โรคโคนเน่าและลำต้นเน่าของธัญพืช เป็นต้น(พัฒนาและคณะ, 2537) ราในสกุลนี้ส่วนใหญ่เป็นราในดินสามารถมีชีวิตอยู่รอดในดินได้นานในรูปของสปอร์ผนังหนาหรือ chlamydospore (Lester และคณะ, 1988; Windels, 1993)

ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิด (species) ราสาเหตุโรคพืชมีความสำคัญและมีการพัฒนาไปอย่างมาก มีการนำวิทยาการทางอณูชีววิทยามาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดจำแนกชนิด ตรวจสอบความเหมือนกันหรือแตกต่างกันของชนิด รวมทั้งการวินิจฉัยสาเหตุของโรคพืชซึ่งโดยทั่วไปดูจากลักษณะสัณฐานวิทยา แต่หากได้มีการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอนเอแล้วจะให้ผลในทางสนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อีกทางหนึ่ง ให้ความถูกต้องแม่นยำและรวดเร็วมากขึ้น รา *Fusarium* spp. เป็นนราที่มีพืชอาศัยจำนวนมากและสามารถดำรงชีพอยู่ในดินได้นานหลายปีและเกิดความผันแปร (variation) ได้ง่าย การเก็บรวบรวมตัวอย่างและจำแนกชื่อชนิดของรา *Fusarium* spp. ทำให้ทราบการเกิดและการระบาดของโรค แหล่งแพร่กระจาย และได้สายพันธุ์พร้อมข้อมูลเก็บรักษาไว้ใน หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมา ข้อมูลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) ของรา *Fusarium* spp. ยังมีไม่ครบถ้วน ดังนั้นจึงทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *Fusarium* spp. สาเหตุโรคพืชที่เก็บรวบรวมไว้แล้วและที่เก็บรวบรวมใหม่ เพื่อให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Fusarium* spp. ซึ่งผลที่ได้จะเป็นองค์ความรู้ด้านโรคพืชนำไปใช้เผยแพร่ได้และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปวิจัยต่อยอดด้านอื่นๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่คาดว่ามีสาเหตุจากรา *Fusarium* spp. จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทยและรา *Fusarium* spp. ที่เก็บอยู่ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์โรคพืช
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Dextrose Agar (PDB), Corn Leaf Ager (CLA) และ KCl
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ และสูง
6. Gel Electrophoresis เครื่องมือตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยแสงยูวี (UV transiluminator)
7. สารเคมี ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

วิธีการ

1. การศึกษาเชื้อสาเหตุและการจำแนกชนิด

แยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค (Tissue transplant) โดยตัดตัวอย่างพืชบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติให้มีขนาดประมาณ 2 x 2 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อที่ผิวพืชโดยแช่ชิ้นส่วนพืชในสารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร water agar บ่มเชื้อไว้ในห้องปฏิบัติการ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ ตัด hyphal tip ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

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 ทำการจำแนกชนิด ศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ดังนี้

ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีรา *Fusarium* spp. ศึกษาการสร้าง pigment sclerotium และ sporodochium บันทึกลักษณะและวัดขนาดของ conidia conidiophore บันทึกการสร้างและลักษณะของ chlamydospore ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell phialide microconidia macroconidia

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *Fusarium* spp.

การเตรียมเส้นใยราและการสกัดดีเอ็นเอ นำรา *Fusarium* spp. ที่จำแนกชนิดแล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน กรองเส้นใย ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำเส้นใยไปเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาสกัด DNA โดยนำเส้นใย 0.2 กรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม extraction buffer 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เติมสารละลาย 5M Nacl 190 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนไปใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่เย็นจัด 800 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 6 นาที เทส่วนใสที่เป็นสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทเอธานอลทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด คว่ำหลอดทิ้งตะกอนไว้ให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดบน agarose gel electrophoresis เป็นเวลา 30 นาที นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 10 นาที แล้วล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกโดยแช่เจลในน้ำสะอาด นำเจลไปตรวจสอบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ทำการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2550
สิ้นสุด กันยายน 2552

สถานที่ทำการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาเชื้อสาเหตุและการจำแนกชนิด

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะโคโลนีตามวิธีการและระบบของ Nelson *et al.* (1983) พบว่ารา *F. oxysporum* และ *F. proliferatum* ที่แยกได้จากส่วนของพืชที่เป็นโรคและราที่เก็บอยู่ในหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ จำนวน 30 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) มีลักษณะดังนี้

***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

รา *Fusarium oxysporum* ทำให้เกิดโรคเหี่ยว (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) ในประเทศไทยพบราชนิดนี้กระจัดกระจายอยู่ทั้งในดินและพืช มากกว่าราชนิดอื่นโดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืชเมืองหนาว ฝ้าย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลี แตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และมันฝรั่ง (ปิยะวดี, 2533)

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 ขนาดความยาวของโคโลนีในหลอดอาหาร มากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน sporodochium มีสีส้ม ถึงสีส้มเข้ม โคโลนีด้านใต้อาหารวุ้นมีสีส้มอ่อน สีม่วงแดง จนถึงสีม่วงคราม บาง isolate สร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร 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

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 หากใช้ระบบการจัดจำแนกของ Nelson ต้องดำเนินการตามขั้นตอนของ Nelson และมีความละเอียดถี่ถ้วน รา *F. proliferatum* มีรายงานของต่างประเทศว่า พบรานี้บนพืชตระกูลกล้วยไม้สกุล*Dendrobium* (http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/f-prolif.htm.) ในประเทศไทยมีรายงานการพบรา *F. proliferatum* บนเอื้องพร้าวที่ อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. oxysporum* และ *F. proliferatum*

2.1 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. oxysporum* ด้วยเทคนิค AFLP ใช้ microsatellite primers (Steenkamp *et al*., 2005) 9 คู่

primer	ลำดับเบส (5'------>3')	primer	ลำดับเบส (5'------>3')
MB2F	TGCTGTGTATGGATGGATGG	MB2R	CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG
MB5F	ACTTGGAGGAAATGGGCTTC	MB5R	GGATGGCGTTTAATAAATCTGG
MB9F	TGGCTGGGATACTGTGTAATTG	MB9R	TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG
MB10F	TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC	MB10R	TTGCAATTACCTCCGATACCAC
MB11F	GTGGACGAACACCTGCATC	MB11R	AGATCCTCCACCTCCACCTC
MB13F	GGAGGATGAGCTCGATGAAG	MB13R	CTAAGCCTGCTACACCCTCG
MB14F	CGTCTCTGAACCACCTTCATC	MB14R	TTCCTCCGTCCATCCTGAC
MB17F	ACTGATTCACCGATCCTTGG	MB17R	GCTGGCCTGACTTGTTATCG
MB18F	GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC	MB18R	TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรา *F. oxysporum* พบว่า คู่ไพรเมอร์ MB11F และ MB11R แสดงให้เห็นความแตกต่างมากที่สุด จากความแตกต่างของราแต่ละไอโซเลท แบ่งที่ความเหมือน 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ

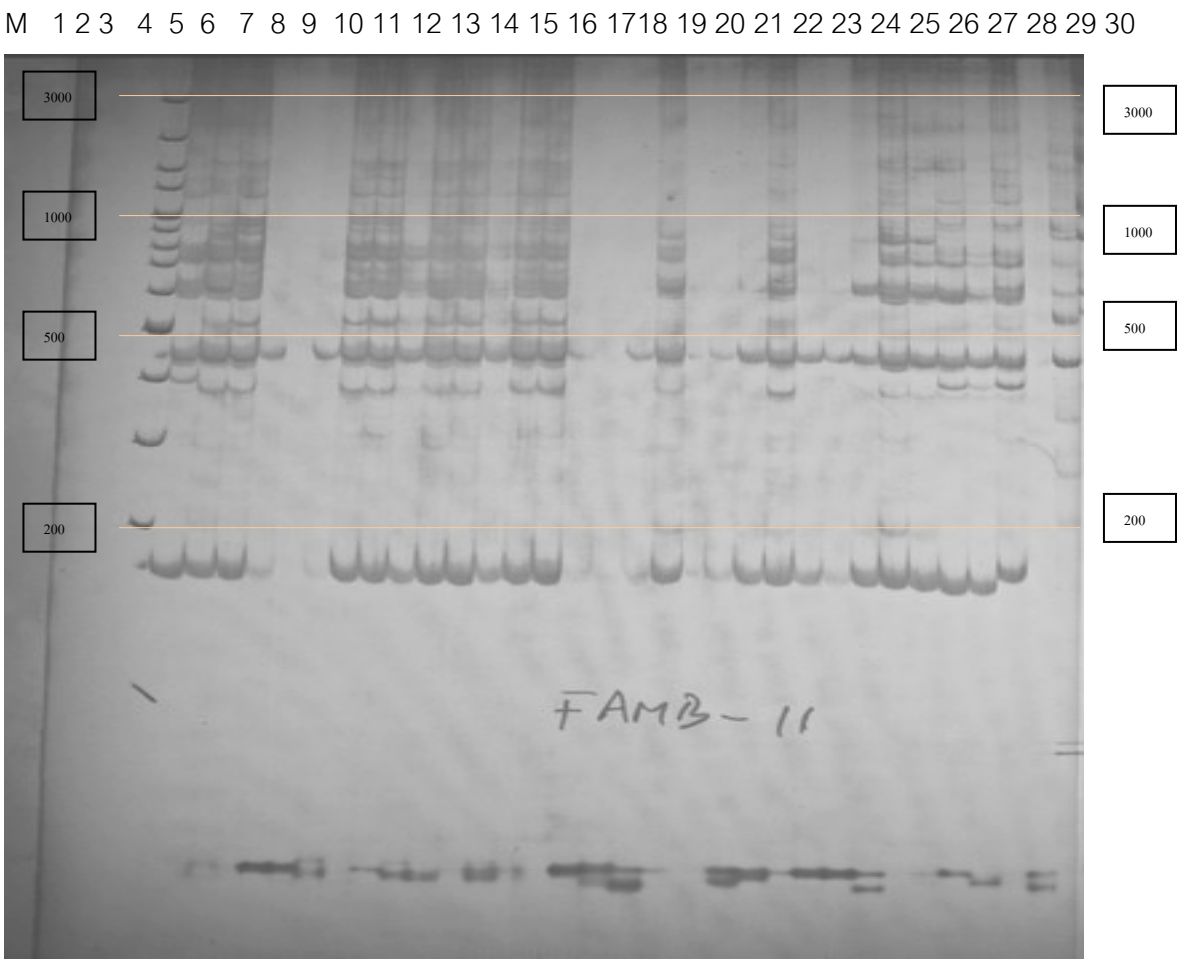
กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้าจากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย 13 สายพันธุ์ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ และรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของปอเทือง จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 2 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวและใบไหม้ของกล้วยไม้และต้น วานิลา จากแหล่งปลูกภาคกลาง 2 สายพันธุ์

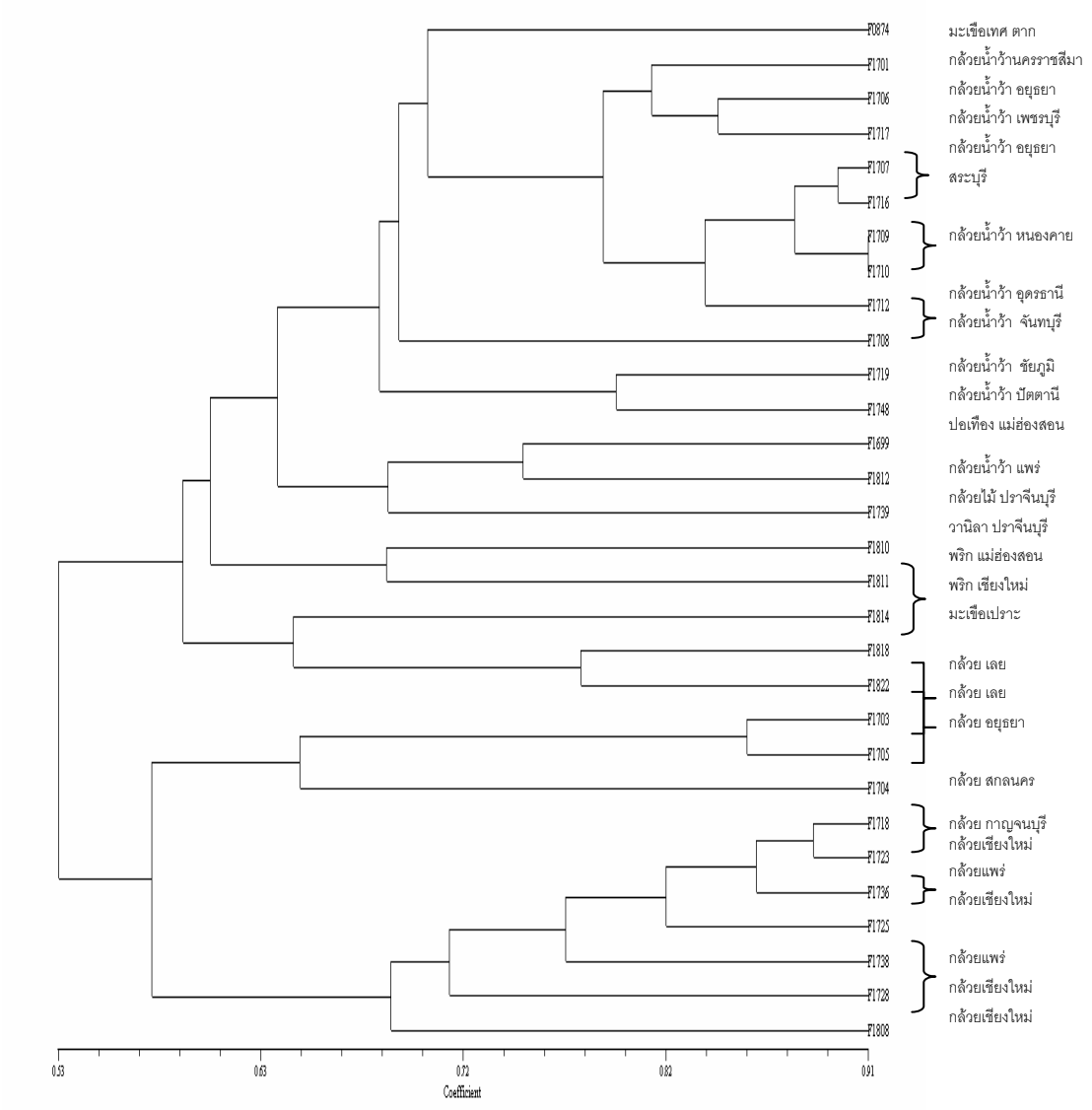
กลุ่มที่ 3 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเปราะ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ 2 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 4 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้าจากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 สายพันธุ์

กลุ่มที่ 5 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้าจากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 6 สายพันธุ์ และจากแหล่งปลูกทางภาคกลาง 1 สายพันธุ์



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *F. oxysporum* ที่เกิดจากเทคนิค AFLP โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MB11F และ MB11R เครื่องหมาย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานใช้ 100 bp plus fermentas กลุ่มตัวเลข คือ ดีเอ็นเอ *F. oxysporum*



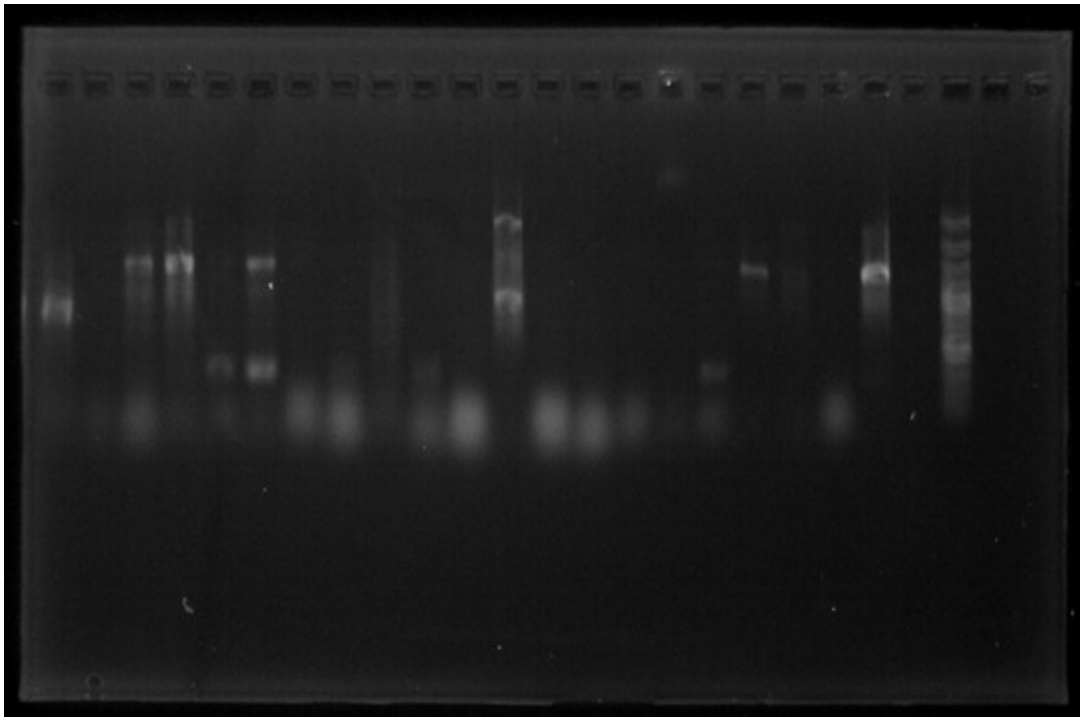
ภาพที่ 2 โครงสร้าง dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรา *F. oxysporum* สังเคราะห์จากไพรเมอร์ MB11F และ MB11R แสดงสหสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ที่แยกจากพืชชนิดต่างๆ ค่า similarity คำนวณด้วยค่า Dice's coefficient จัดกลุ่มด้วยโปรแกรม UPGMA

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ด้วยเทคนิค RAPD ใช้ primers

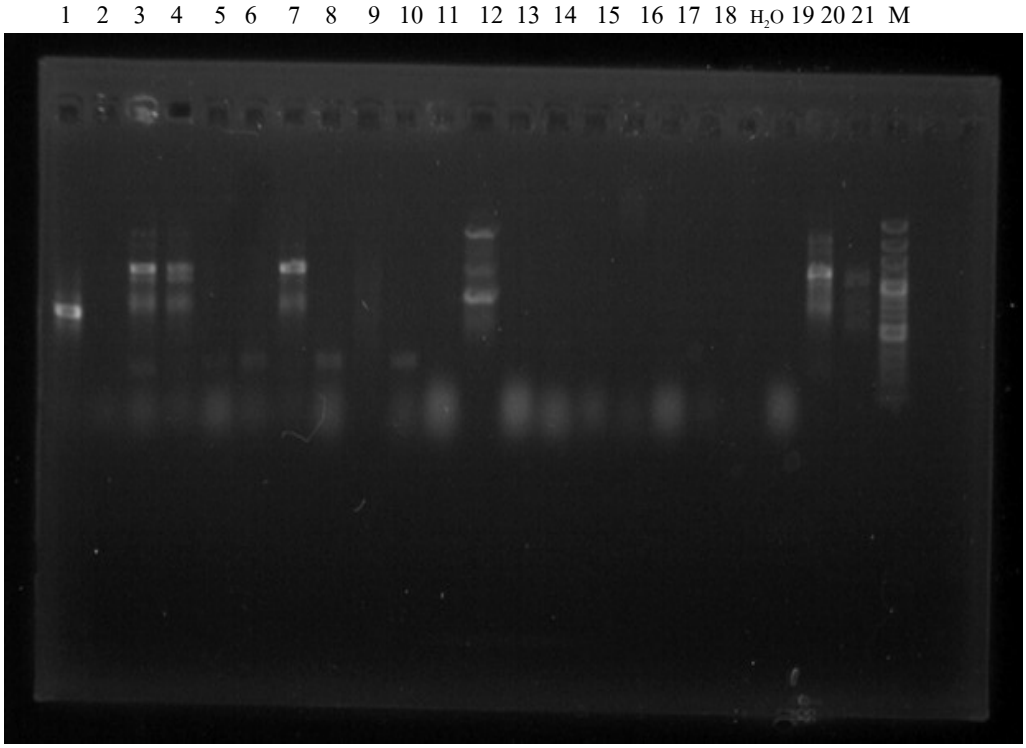
primer	ลำดับเบส (5'------>3')	primer	ลำดับเบส (5'------>3')
PFE08	CTCTCCGCCA	PFE12	GGAGGGTGTT

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของรา *F. proliferatum* 20 ไอโซเลท พบว่า การเกิดแถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ PFE08 และ PFE12 (ภาพที่ 3 และภาพที่ 4) ยังไม่สามารถเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างได้ การสรุปผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ไอโซเลทต่างๆ จึงยังไม่สามารถทำได้ ถึงแม้ว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ PFE12 แถบดีเอ็นเอเลน 3 และเลน 4 แถบดีเอ็นเอเลน 5 และเลน 6 จะให้ผลใกล้เคียงกัน ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอของรา *F. proliferatum* ที่เป็นสาเหตุโรคของกล้วยไม้และของข้าว ตามลำดับ ดังนั้นการทดลองนี้จึงเป็นการทดลองเริ่มต้นในการศึกษาหาไพรเมอร์ ชนิดต่างๆมาใช้เพื่อให้สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างราทุกไอโซเลทได้

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 M



ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *F. proliferatum* ที่เกิดจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ PFE08 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน ใช้ 100 bp plus fermentas



ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *F. proliferatum* ที่เกิดจากเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ PFE12 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP สามารถแบ่งการกระจายตัวทางพันธุกรรมของรา *Fusarium oxysporum* ได้เป็น 5 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทั่วทุกภาคของประเทศไทย 13 สายพันธุ์ รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ และรา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของปอเทือง จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวและใบไหม้ของกล้วยไม้และวานิลา จากแหล่งปลูกภาคกลาง 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวของพริกและมะเขือเปราะ จากแหล่งปลูกภาคเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 5 ได้แก่รา *F. oxysporum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวหรือตายพรายของกล้วยน้ำว้า จากแหล่งปลูกทางภาคเหนือ 6 สายพันธุ์ และจากแหล่งปลูกทางภาคกลาง 1 สายพันธุ์

ส่วนการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* โดยวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ไม่สามารถสรุปผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของราแต่ละไอโซเลทที่นำมาทดลองได้ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ PFE08 และ PFE12 ไม่แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างทางพันธุกรรมของรา *F. proliferatum* ที่นำมาทดลอง ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปต้องทำการศึกษาไพรเมอร์จำนวนหลายชุด ให้สามารถแสดงความเหมือนหรือความแตกต่างของราแต่ละไอโซเลท เพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลมาวิเคราะห์ได้

เอกสารอ้างอิง

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ. 2533. ชนิดของเชื้อรา *Fusarium* จากพืชและดินในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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.

Booth, C. 1971. The Genus Fusarium. C.M.I., Kew, Surrey, England. 237 p.

http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/f-prolif.htm

Lester, W. B., C. M. Liddell and B. A. Summerell. 1988. Laboratory Manual for Fusarium Research Incorporating a Key and Descriptions of Common Species Found in Australia, 2nd ed. University of Sydney, Australia. 156 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.

Windels, C. E. 1991. Current status of *Fusarium* taxonomy. Phytopathology 81:1948 - 1951

ตารางที่ 1 รา *F. oxysporum* จำนวน 30 ไอโซเลทและแหล่งที่มา

ลำดับที่	รหัส	ชื่อเชื้อ	พืชอาศัย	โรค/อาการโรค	สถานที่เก็บโรค
1	DOAC 0874	*F. oxysporum* f.	มะเขือเทศ	ต้นเหี่ยว	ต.ช่องแคบ อ.พบพระ จ.ตาก
2	DOAC 1699	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.ปัตตานี
3	DOAC 1701	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	ต.ไทยสามัคคี อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
4	DOAC 1703	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เลย
5	DOAC 1704	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภู-พาน อ.เมือง จ.สกลนคร
6	DOAC 1705	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.พระนครศรีอยุธยา
7	DOAC 1706	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.พระนครศรีอยุธยา
8	DOAC 1707	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.พระนครศรีอยุธยา
9	DOAC 1708	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.อุดรธานี
10	DOAC 1709	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.หนองคาย
11	DOAC 1710	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.หนองคาย
12	DOAC 1712	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.หนองคาย
13	DOAC 1716	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.สระบุรี
14	DOAC 1717	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เพชรบุรี
15	DOAC 1718	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.กาญจนบุรี
16	DOAC 1719	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.จันทบุรี
17	DOAC 1723	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
18	DOAC 1725	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
19	DOAC 1728	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
20	DOAC 1736	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
21	DOAC 1738	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่
22	DOAC 1739	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.เชียงใหม่

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ชื่อเชื้อ	พืชอาศัย	โรค/อาการโรค	สถานที่เก็บโรค
23	DOAC 1748	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	จ.ชัยภูมิ
24	DOAC 1808	*F. oxysporum*	กล้วยน้ำว้า	ต้นเหี่ยว ตายพราย	ต.ขี้เหล็ก อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
25	DOAC 1810	*F. oxysporum*	กล้วยไม้	ต้นเหี่ยว ใบไหม้	ต.เนินหอม อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
26	DOAC 1811	*F. oxysporum*	วนิลา	เถาเหี่ยว	ต.เนินหอม อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
27	DOAC 1812	*F. oxysporum*	ปอเทือง	ต้นเหี่ยว	ต.สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
28	DOAC 1814	*F. oxysporum*	พริก	ต้นเหี่ยว	ต.สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
29	DOAC 1818	*F. oxysporum*	พริก	ต้นเหี่ยว	ต.บ่อหลวง อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
30	DOAC 1822	*F. oxysporum*	มะเขือเปราะ	ต้นเหี่ยว	ต.สบป่อง อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมรา *Phytophthora parasitica* [1]

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ได้ศึกษารา *Phytophthora* spp. ที่ได้จากการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า โคนเน่า ผลเน่า จากพืชชนิดต่างๆ ในแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศ ในปี พ.ศ. 2550-2551 และเชื้อที่มีอยู่ใน culture collection รวม 14 จังหวัด คือ กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครปฐม ปราจีนบุรี ระยอง จันทบุรี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กระบี่ ภูเก็ต กำแพงเพชร ลำปาง และเชียงใหม่ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ รา *Phytophthora*. spp. 33 ไอโซเลท ที่เป็นสาเหตุโรคพืช 12 ชนิด คือ หมากผู้ หมากเมีย เดหลี ยางพารา ลองกอง ทุเรียน มะเขือ (มะเขือม่วงผลเล็ก และมะเขือม่วงผลใหญ่ มะเขือยาว) สะระแหน่ สับปะรด ส้ม กล้วยไม้ หน้าวัว และแพงพวยฝรั่ง (แพงพวยบก) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เชื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์และศึกษาแบบคู่ผสมของรา *Phytophthora*. spp. จำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบ รา *P. parasitica* จำนวน 29 ไอโซเลท เป็นสาเหตุโรคเน่าของพืชที่ศึกษา และพบ รา *P. heveae* เป็น สาเหตุโรคกล้าเน่าของกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ รา *P. palmivora* เป็น สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน สาเหตุโรคหน้ายางพาราเน่าจากปราจีนบุรี คือ รา *P. parasitica* แต่สาเหตุโรคหน้ายางพาราเน่า จากจันทบุรี คือ รา *P. botryosa* และรา *Pythium* sp. แยกได้จากต้นหน้าวัว

ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora* spp. ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล 2 ชนิด คือ SSR-PCR และ AFLP ด้วยเทคนิค SSR-PCR โดย microsattlelite ไพรเมอร์ จำนวน 9 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 220 แถบ จากพืชอาศัย 6 ชนิด ได้แก่ ยางพารา (โรคหน้ายางพาราเน่า จากปราจีนบุรี) สับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ ส้ม และ *Pythium* sp. จากหน้าวัว วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม NTSys 2.22e (Dice coefficient) Phylogenetic tree แบ่งกลุ่มรา *Phytophthora* spp. ออกจากรา *Pythium* sp. ที่ 30% similarity รา *Phytophthora* spp. จำแนกเป็น 4 กลุ่ม คือ A เป็นรา *P. parasitica* จากยางพารา กลุ่ม B ประกอบด้วยรา *P. parasitica* จากสับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ และส้ม ด้วยค่า

รหัสโครงการ 09-01-49-02

similarity 45-80 % กลุ่ม C เป็นรา *P. haveae* สาเหตุโรคกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่ม D เป็นรา *P. palmivora* สาเหตุโรคกล้วยไม้ ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ชัดเจนกับพืชอาศัยหรือแหล่งปลูกพืช ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ไพรเมอร์ E+A/M+AAC ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 65 แถบ แบ่งราออกเป็น 7 กลุ่ม พบความสัมพันธ์ของลักษณะพันธุกรรมกับพืชอาศัยและแหล่งปลูกพืชในบางกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม A เป็นไอโซเลท ของรา สาเหตุโรคกล้วยไม้ จากจังหวัดเชียงใหม่ (similarity 45-75 %) (จำแนกทางสัณฐานวิทยาได้เป็นรา *P. parasitica* และ *P. haveae*) กลุ่ม B เป็นไอโซเลทของหน้าวัว จากจังหวัดภูเก็ต ลำปาง และ ปราจีนบุรี ยกเว้นไอโซเลทจากกรุงเทพมหานคร ที่มีความแตกต่างจากไอโซเลทอื่น จัดอยู่ในกลุ่ม F เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรง กลุ่ม C เป็นไอโซเลทจากมะเขือ สะระแหน่ และเดหลี กลุ่ม D เป็นไอโซเลทจากยางพารา และส้ม และกลุ่ม E, F เป็นไอโซเลทจากหมากผู้หมากเมียและลองกอง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลแสดงให้เห็นว่ารา *Phytophthora parasitica* จากพืชอาศัยชนิดต่างกัน มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

คำนำ

Phytophthora spp. เป็นราศัตรูพืชที่สำคัญ ทำลายพืชผลที่สำคัญทางเศรษฐกิจทั่วโลก (ทวี, 2545) ราสกุล *Phytophthora* บาง species สามารถเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้บนอาหารสังเคราะห์ เช่น *P. parasitica* สาเหตุโรครากเน่าส้ม และ *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน แต่บาง species ก็ไม่สามารถเลี้ยงได้ เช่น *P. infestans* ราสาเหตุโรคใบไหม้มะเขือเทศและมันฝรั่ง หรือมีความยากในการเลี้ยงเชื้อ เช่น *P. milabiris* สาเหตุโรคราน้ำฝนลำไย เป็นต้น สำหรับราที่เลี้ยงให้เจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์นั้น แม้จะเป็น species เดียวกัน เป็นสาเหตุโรคพืชเดียวกัน แยกได้จากสถานที่แตกต่างกัน ยังพบความแตกต่างในการเจริญเติบโตบนอาหารสังเคราะห์ เช่น รา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนจากแยกจากทุเรียนจังหวัดจันทบุรี เจริญเติบโตดีและเร็วกว่ารา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนบางไอโซเลทจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี (อมรรัตน์ และคณะ, 2546) และพบความแตกต่างของความรุนแรงและความอ่อนแอของราใน species เดียวกัน

การวินิจฉัยราสาเหตุของโรค โดยทั่วไปดูจากลักษณะสัณฐานวิทยา แต่หากเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอนเอ จะให้ผลการสนับสนุนการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้อีกทางหนึ่ง ตัวอย่างเช่น การรายงานการระบาดของโรคใบไหม้และผลเน่าของลำไย โดยขจรศักดิ์และคณะ (2542, 2543) รายงานว่ามีสาเหตุจาก *Phytophthora capsici* แต่ อมรรัตน์และคณะ (2549) ได้ศึกษารายละเอียดของโรคลำไยดังกล่าว ในปี พ.ศ. 2547 ยืนยันว่า *Phytophthora* sp. สาเหตุของ

โรคกิ่งไหม้และใบไหม้ของลำไย เป็น *P. mirabilis* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ของไม้ดอกชนิดหนึ่ง (*Mirabilis jalapa*)

นอกจากนี้ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช ได้รวบรวมตัวอย่างรา *Phytophthora* สาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แบบคู่ผสม เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิชาการของเชื้อไว้แล้ว จึงควรทำการศึกษาลายพิมพ์ DNA ของราดังกล่าว ซึ่งเป็นข้อมูลทางพันธุกรรม เพื่อให้ได้ข้อมูลพันธุกรรม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของ รา *Phytophthora parasitica* Dastur สาเหตุโรคพืชที่มีพืชอาศัยจำนวนมาก และเพื่อให้ทราบความสัมพันธ์ของข้อมูลกับปัจจัยสำคัญ เช่น แหล่งปลูก พืชอาศัยของรา *P. parasitica* แล้วจัดกลุ่มของเชื้อตามลักษณะข้อมูลพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคพืช จากแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศและการแยกเชื้อสาเหตุ

ได้สำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ จากแหล่งปลูกทั่วประเทศ แล้วนำตัวอย่างโรคพืชเหล่านั้นมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ในวันเดียวกัน โดยวิธี tissue transplanting ตัดบริเวณรอยต่อเนื้อเยื่อที่เป็นโรคกับเนื้อเยื่อปกติ เป็นชิ้นส่วนขนาด 2x2 มม. ตัวอย่างละ 15-20 ชิ้น เลี้ยงบนอาหาร PDA + BRNAP เพาะเชื้อในอุณหภูมิห้อง (25 $\pm$ 2^{0}ซ.) เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยเชื้อที่เจริญออกจากชิ้นตัวอย่าง เลี้ยงบนอาหาร PDA + BRNAP อีกครั้ง เพาะเชื้อในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ตัดขอบโคโลนีของเส้นใยเชื้อที่เจริญออกจากชิ้นเชื้อ เลี้ยงบนอาหาร CA (Carrot agar) แล้วแยกเก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละตัวอย่างในหลอดทดลองที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของ รา *Phytophthora* spp.

2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

ได้เลี้ยงรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CA จำนวน 15 มล. เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อซึ่งเลี้ยงบนอาหาร CA นาน 5 วัน วางให้ด้านที่มีเส้นใยของเชื้อคว่ำลงบนอาหารบริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มมืดอุณหภูมิห้อง จนเชื้อเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ศึกษาบันทึกลักษณะการเจริญที่ผิวหน้าอาหารและความหนาแน่นของเส้นใย

2.2 การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของรา

ได้นำรา *Phytophthora* ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ CA จำนวน 15 มล. ตัดชิ้นเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง CA แช่ในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 24-36 ชั่วโมง นำไปไว้ใต้แสงนีออน (white cool) 40 วัตต์ 2 หลอดระยะ 30 ซม.ที่ให้แสง 200 ftc ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยไว้ใต้แสงนาน 48 ชม. เพื่อให้เชื้อสร้าง sporangia ศึกษาและบันทึกลักษณะการแตกแขนงของก้านสปอร์ (sporangiophores) วัดความกว้าง (length) และความยาว (breadth) ของ sporangia เพื่อหา L : B ratio วัดความยาวของก้านสปอร์ (pedicel หรือ stalk) ความยาวของ papilla และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ chlamydospore ศึกษาสปอร์ทั้ง 2 ชนิด จำนวนตัวอย่างละ 50 สปอร์

2.3 การศึกษา mating type (แบบคู่ผสม) ของรา

ได้เลี้ยงรา *Phytophthora* แต่ละไอโซเลท บนอาหาร CA วิธีการเดียวกับ ข้อ 2.1 จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มม. ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ เชื้อดังกล่าว (unknown) เลี้ยงบนอาหาร CA ในจานเลี้ยงเชื้อด้านตรงข้ามกับรา *P. palmivora* มาตรฐานที่ทราบ mating type แล้ว คือ mating type A1 (*P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าลำไย) แล้วทำวิธีการเดียวกันกับรา *P. palmivora* มาตรฐาน mating type A2 (*P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าแก้วหน้าม้า) เพื่อหา mating type ของราทุกไอโซเลท นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืดนาน 7-10 วัน ศึกษาและบันทึกการสร้าง sexual structure ของเชื้อ unknown กับ A1 หรือ A2 มาตรฐาน วัดขนาด (ความกว้างและความยาว) ของ oogonia, oospores และ antheridia จำนวนไอโซเลทละ 50 สปอร์ ศึกษาตำแหน่งของ antheridia บนผิวของ oogonium และลักษณะของ oospore ที่อยู่ภายในแต่ละ oogonium

3. การจำแนกชนิดรา *Phytophthora* spp.

ได้เปรียบเทียบผลการศึกษา ลักษณะการเจริญเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ชนิดต่างๆ คือ sporangia, chlamydospores, oogonia, antheridia และ oospores ของราที่นำมาศึกษา กับ คู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Waterhouse (1970), Stamps *et al* (1990) และเอกสาร ของ Erwin and Ribeiro (1996)

การจำแนกชนิดรา *Pythium* spp.

ได้เปรียบเทียบผลการศึกษาลักษณะการเจริญเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ชนิดต่างๆ (sporangium, chlamydospores, oogonia, antheridia และ oospores) ของราที่นำมาศึกษา กับคู่มือการจำแนกชนิด *Pythium* ของ PLAATS-NITERINK (1981) และ เอกสารวิชาการของ Robertson (1980)

4. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora*

4.1 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora parasitica* ด้วยเทคนิค SSR- PCR ไพรเมอร์ microsatellite

การเตรียมเส้นใย และสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทบนอาหาร carrot agar (CA) จากนั้นเขี่ยเส้นใยบนอาหารใส่ในขวดอาหารเหลว นำอาหารเลี้ยงเชื้อราที่ได้จาการเขย่าจนขุ่น ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มล. ตกตะกอนเส้นใยโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 14000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ได้เส้นใยมากขึ้น บดเส้นใยด้วย เม็ดสเตนเลส ขนาด 3.9 มม เติม lysis buffer 700 มิลลิลิตร เขย่าหลอดด้วยเครื่องเขย่าข ที่ 25 Hz นาน 1 นาที แช่หลอดใน water bath ที่ 65°C นาน 10 นาที เติม precipatation buffer 224 µl (32µ/ 100 µl lysis buffer) และเติม CH_2Cl_2 100 µl กลับหลอด 10 ครั้ง นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง 5 นาที 14,000 rpm ดูดน้ำใส 700 µl ใส่หลอด microcentrifuge ใหม่ เติม isopropanol 700 µl กลับหลอด 10 ครั้ง ตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยวที่ 14,000 rpm 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol Pulse spin 10 นาที ดูด ethanol ที่เหลือทิ้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่เติม RNase (10 µg/ml) ประมาณ 10 µl

สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากตัวอย่างรา 14 ไอโซเลท ด้วยไพรเมอร์ 9 คู่ ดังนี้

No.	Name	5'----------->3'	length
1	MB2F	TGCTGTGTATGGATGGATGG	20
	MB2R	CATGGTCGATAGCTTGTCTCAG	22
2	MB5F	ACTTGGAGGAAATGGGCTTC	20
	MB5R	GGATGGCGTTTAATAAATCTGG	22
3	MB9F	TGGCTGGGATACTGTGTAATTG	22
	MB9R	TTAGCTTCAGAGCCCTTTGG	20
4	MB10F	TATCGAGTCCGGCTTCCAGAAC	22
	MB10R	TTGCAATTACCTCCGATACCAC	22
5	MB11F	GTGGACGAACACCTGCATC	19
	MB11R	AGATCCTCCACCTCCACCTC	20

6	MB13F	GGAGGATGAGCTCGATGAAG	20
	MB13R	CTAAGCCTGCTACACCCTCG	20
7	MB14F	CGTCTCTGAACCACCTTCATC	21
	MB14R	TTCCTCCGTCCATCCTGAC	19
8	MB17F	ACTGATTCACCGATCCTTGG	20
	MB17R	GCTGGCCTGACTTGTTATCG	20
9	MB18F	GGTAGGAAATGACGAAGCTGAC	22
	MB18R	TGAGCACTCTAGCACTCCAAAC	22

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ประกอบด้วย ddH_2O 7.5 µl, 10X PCR (add 20 mM $MgCl_2$) 2.5 µl, dNTPs (2.5 mM) 10 µl, Forward primer (10µM) 1 µl, Reverse primer (10 µM) 1 µl , DNA template 100 ng 2 µl รวม 25 µl นำหลอดทดลอง เข้าเครื่อง PCR ตามโปรแกมต่อไปนี้ 94°C 2 นาที 1 รอบ แล้วสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ จำนวน 25 รอบ อุณหภูมิ 94°C 1 นาที

55-60 °C 1 นาที 72°C 1 นาที และfinal extension 72°C 5 นาที

ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (Promega, Madison, WI) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วย 5% polyacrylamide gel โดยใช้ sequencing apparatus ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE) แล้วตรวจดูแถบและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย silver staining

การบันทึกข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS 2.22e (Rohlf, 1994) ค่า coefficient ใช้ Dice วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ และวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่าง ไอโซเลท พืชอาศัย และ แหล่งที่มาของเชื้อ

4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ รา *Phytophthora parasitica*โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

การเตรียมเส้นใยและสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมเส้นใยเชื้อรา โดยเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทบนอาหาร carrot agar (CA) จากนั้นเขี่ยเส้นใยบนอาหารใส่ในขวดอาหารเหลว CA วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนเส้นใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเขี่ยเส้นใยขึ้นมา ล้างด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อซับน้ำให้แห้ง (สามารถเก็บเส้นใยไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสได้นานก่อนสกัด)

การสกัดดีเอ็นเอ นำเส้นใยที่แห้งมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ในปริมาตร 0.05 กรัม เติม extraction buffer (50 mM Tris HCL, 850 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SPS) ในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม phenol และ chloroforml ในปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อสกัดเอาเศษเซลล์และโปรตีนอื่นๆออก ดูด supernatant (ส่วนใส่ด้านบน) ใส่หลอดใหม่แล้วเติมchloroform/isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูด supernatant(ส่วนใส) ใส่หลอดใหม่ เติม Ethanol ในปริมาตร 2 เท่า ของสารละลาย พลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ incubate ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอน DNA เท supernatant (ส่วนใส) ด้านบนทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol 200 มิลลิลิตร แล้วหมุนเหวียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง (เพื่อล้าง DNA) เท supernatant (ส่วนใส) ทิ้ง ตากตะกอน DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30 นาที จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วย TE (10 mM Tris- HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA) 50 µl แล้วเก็บไว้ที่ - 20°C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค AFLP (Vos *et al.,* 1995) โดยปรับ reaction และ condition บางส่วน ดังนี้ นำดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ปรับให้มีความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ในน้ำ 5.5 ไมโครลิตร เติม restriction buffer ประกอบด้วย เอ็นไซม์ EcoRI (NEB) 5 units, MseI (NEB)1 units , 10X Ligase buffer with ATP 1.1 ไมโครลิตร, 0.5 M NaCl 1.1 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA 0.55 ไมโคลิตร และน้ำ ปริมาตรรวม 9 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการต่อ adaptor โดยเติม ligation buffer ประกอบด้วย 10X Ligase buffer 0.1 ไมโครลิตร, 0.5 M NaCl 0.1 ไมโครลิตร, 1 mg/ml BSA 0.05 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ T4DNA ligase (regular conc.) 0.165 ไมโครลิตร 5 µM EcoRI adapter pair 1 ไมโครลิตร 50 µM MseI adapter pair 1 ไมโครลิตร และ

ปรับปริมาตรรวมสุดท้ายเท่ากับ 12 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ลำดับเบสของ Adapter

EcoRI adapter 5' –CTCGTAGACTGCGTACC

CATCTGACGCATGGTTAA-5'

MseI adapter 5' –GACGATGAGTCCTGAG

TACTCAGGACTCAT -5'

จากนั้นใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เป็นต้นแบบ เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอโดยสุ่มในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 10X PcR buffer with 15 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร, 1.25 mM dNTPs 1.6 ไมโครลิตร 5 u/ul Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Eco (+selective base) (5 uM) 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Ms (+selective base) (5 uM) 1 ไมโครลิตร และน้ำ ให้มีปริมาตรสุดท้าย ผสมสารประกอบในปฏิกิริยาดังกล่าวข้างต้นให้เข้ากัน แล้วบ่มหลอดปฏิกิริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ PE 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอดังนี้

ปฏิกิริยา	**อุณหภูมิ** (°C)	**เวลา**	
1.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น (initial denaturation)	95	2 นาที	
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94	20 วินาที	⎫
3.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)	66(-1)	30 วินาที	⎭ 10รอบ
4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension)	72	2 นาที	
5.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94	20 วินาที	⎫
6.เริ่มต้นจับคู่ไพเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)	56	30 วินาที	⎭ 20รอบ
7.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอต่อจากดีเอ็นเอแม่แบบ(extension)	72	2 นาที	
8.สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72	15 นาที	

ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ โดยปรับลดอุณหภูมิ annealing 1 องศาเซลเซียส ในทุก ๆ รอบ จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 56 องศาเซลเซียส แล้วสังเคราะห์ต่ออีก 20 รอบ สังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย นาน 15 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20

ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (Promega, Madison, WI) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วย 5% polyacrylamide gel โดยใช้ sequencing apparatus ในบัฟเฟอร์ 1X Tris-borate EDTA (TBE)ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 65 วัตต์ นาน 2.5 ชั่วโมง แล้วตรวจดูแถบและรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย silver staining

จากนั้นจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Phytophthora parasitica* จำนวน 19 ไอโซเลท จากพืชอาศัย 9 ชนิด คือ กล้วยไม้ หน้าวัว เดหลี สะระแหน่ มะเขือ ส้ม ยางพารา หมากผู้หมากเมีย และลองกอง โดยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ Eco-AC/ Ms-AG, Eco-AG/MsAC และ Eco-A/ Ms-AAC

การบันทึกข้อมูลรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เป็น 0 นำผลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS 2.22e (Rohlf, 1994) coefficient ใช้ Dice วิเคราะห์ dendrogram จัดกลุ่มเชื้อ และวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996) เปรียบเทียบความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม ระหว่าง ไอโซเลท พืชอาศัย และ แหล่งที่มาของเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. สำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคพืช จากแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศและการแยกเชื้อสาเหตุ

ผลการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า ต้นเน่าของพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจแล้วแยกเชื้อสาเหตุ จากแหล่งปลูกทั่วประเทศ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ได้ รา *Phytophthora*. spp. 33 ไอโซเลท จาก 14 จังหวัด คือ กรุงเทพฯ ปทุมธานี นครปฐม ปราจีนบุรี ระยอง จันทบุรี เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ กระบี่ ภูเก็ต กำแพงเพชร ลำปาง และเชียงใหม่ บนพืช 12 ชนิด คือ หมากผู้หมากเมีย เดหลี ยางพารา ลองกอง ทุเรียน มะเขือ (มะเขือม่วงผลเล็ก และมะเขือม่วงผลใหญ่ มะเขือยาว) สะระแหน่ สับปะรด ส้ม กล้วยไม้ หน้าวัว และแพงพวยฝรั่ง (แพงพวยบก) (ตารางที่ 1)

ผลการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า โคนเน่า ผลเน่า ที่มีสาเหตุจาก รา *Phytophthora* spp. จากแหล่งปลูกพืช ในปี พ.ศ.2550-2552 พบ โรคใบไหม้ของเดหลี (51 Pl Pb R 1 L) โรคต้นเน่าของกล้วยไม้ (51 Or Pb R 1 S Mokara และ 51 Or PB 1 L Vanda) โรคใบไหม้ต้นเน่าของหน้าวัว (51 An PB 1 L) ซึ่งตรงกับการรายงานของนิยมรัฐ (2544) รายงานการเกิดโรคเน่าดำ หรือโรคใบแห้งหน้าวัว เกิดจาก *P. parasitica* (นิยมรัฐ, 2544) และโรคโคนเน่าของแพงพวย (51 MP BK 1 S) นอกจากนี้ได้ศึกษา รา *Phytophthora* spp. ที่มีอยู่ใน culture collection บนพืช 9 (10) ชนิด คือ หมากผู้หมากเมีย ยางพารา ลองกอง ทุเรียน มะเขือ (มะเขือยาว มะเขือม่วงผลเล็ก

และมะเขือม่วงผลใหญ่) สะระแหน่ สับปะรด ส้ม กล้วยไม้ และหน้าวัว ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ยังไม่พบการเข้าทำลายของรานี้ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ตรงกับการรายงานของ Brasier และ Hansen (1992) ที่รายงานว่ารา *Phytophthora* ส่วนมากทำให้เกิดโรคก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับพืชใบเลี้ยงคู่ (Brasier and Hansen, 1992) การแยกรา *Phytophthora* จากส่วนต่างๆ ของพืชที่เป็นโรคโดยวิธี tissue transplanting นั้น ความยุ่งยากคือต้องแยกเชื้อบริสุทธิ์ในวันเดียวกัน มิฉะนั้นจะเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย (อมรรัตน์และคณะ, 2544) และต้องนำมาแยก รา *Phytophthora* บนอาหารสังเคราะห์พิเศษ PDA + BRNAP 2 ครั้ง ครั้งแรกเพื่อแยกเชื้อสาเหตุโรคจากชิ้นส่วนพืช ครั้งที่สองเพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วจึงเลี้ยงบนอาหารแข็ง CA (Carrot agar) การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากโรคโคนเน่า ใบเน่าของกล้วยไม้และหน้าวัว ไม่สามารถแยกได้โดยง่าย เนื่องจากเกษตรกรมีการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคอย่างมาก

ในรายงานดรรชนีรายชื่อโรคพืชในประเทศไทยของพัฒนาและคณะ (2537) มีการพบและรายงานโรคพืชในประเทศไทยที่เกิดจาก รา *P. parasitica* กว่า 30 ชนิด ได้แก่ พืชไร่ เช่น โรคสมอดำ (Phytophthora boll rot) ของฝ้าย, โรคเน่าคอดิน (Damping-off) ของปอคิวบา, โรคข้อต่อเน่า (Collar rot) ต้นเน่า (Stem rot) และเน่าคอดิน (Damping-off) ของปอแก้ว, โรคแข้งดำ (Black shank) ของยาสูบ, โรคใบไหม้และลำต้นเน่า (Phytophthora blight) ของงา, โรครากเน่า (Root rot) ของหม่อนและโรครากเน่า (Root rot) ของละหุ่ง พืชสวน เช่น โรคยอดเน่า (Heart rot) รากเน่า (root rot) ของสับปะรด, โรครากเน่า (root rot) ใบไหม้ (Leaf blight) ของส้มจุก ส้มจีน, โรครากเน่าของส้มโชกุน ส้มโอขาวน้ำผึ้ง ส้ม Rough lemon, โรคใบร่วง Leaf fall (Leaf blight) ของยางพารา, โรครากเน่า (ระยะกล้า) Root rot (Seedling) ของมะม่วงหิมพานต์, โรคโคนเน่า (Foot rot) ของมะนาว มะนาวไทย, โรคใบไหม้ ผลเน่า ดอกเน่า (Brown rot, Leaf blight) ของมะนาวตาฮิติ, โรครากเน่าโคนเน่าของส้มเกลี้ยง ส้มตรา ส้มเขียวหวาน, โรคลำต้นเน่า (Stem rot) ของสตรอเบอรี่, โรครากเน่าโคนเน่า (Stem rot, Collar rot) ของแพสชั่นฟรุต, โรคผลเน่าและใบไหม้ (Fruit rot, Leaf blight) ของพุทรา, พืชสวนสมุนไพร โรคโคนและรากเน่า (Foot and root rot) ของพริกไทยและพลู พืชผัก เช่นโรคใบไหม้ (Leaf blight) ของสะระแหน่, โรคโคนต้นเน่า (Foot rot) ของกระเจี๊ยบแดง, โรคราน้ำค้าง (Downy mildew) ของผักกาดหัว, โรคผลเน่า (Fruit rot) ของมะเขือยาว, โรคโคนเน่าและรากเน่าของกล้า (Seedling root rot) ของมะกรูด ไม้ดอกและไม้ประดับ เช่น โรคลำต้นเน่า (stem rot) ของว่านหางจระเข้, โรคเน่าดำ (Black rot) ของกล้วยไม้ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันไม่มีการปลูกพืชไร่หลายชนิด หรือมีการปลูกน้อย ไม่พบการเข้าทำลายของ รา *P. parasitica* บนพืชเหล่านั้น เช่น ฝ้าย ปอคิวบา และปอแก้ว ส่วนพืชหลายชนิด เช่น สับปะรด พืชตระกูลส้ม พริกไทย สะระแหน่ และมะเขือยาว รา *P. parasitica* ยังคงแพร่ระบาดทำความเสียหายตลอดมาจนถึงปัจจุบัน

อมรรัตน์ (2546) รายงานพบการเป็นโรครากเน่าโคนเน่าของส้มโชกุน อายุ 13 ปี ที่สวนส้มตำบลหน้าเขา อำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ แสดงอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้งและร่วง มีลักษณะโคนเน่าแห้ง เมื่อเปิดเปลือกบริเวณโคนต้นและราก พบว่าเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตัดกับส่วนปกติที่มีสีขาว บางต้นมีเส้นใยสีขาวของราบางชนิดขึ้นคลุม บางต้นพบเห็ดขึ้นแล้วยืนต้นตาย และยังได้รายงานการพบการเกิดโรคโคนเน่ารากเน่าของลองกองต้นใหญ่ในสวนเกษตรกร ที่ตำบลเขาใหญ่ อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ แสดงอาการใบเหลือง เหี่ยวแห้งและร่วง กำลังยืนต้นตาย เมื่อเปิดเปลือกบริเวณโคนต้นและราก พบว่าเนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลตัดกับส่วนปกติที่มีสีขาวเช่นเดียวกัน รากแขนงและรากฝอยที่เป็นโรคมีสีน้ำตาล รายงานว่าเชื้อสาเหตุของโรครากเน่าโคนเน่าสองกองและส้มโชกุน คือ รา *P.parasitica* และอมรรัตน์ (2548) รายงานการเกิดโรคผลเน่าในมะเขือม่วง พบว่ามีอาการฉ่ำน้ำ หรือเน่าเล็กน้อยบริเวณขั้วผล อาการเน่านี้ขยายออกไปอย่างรวดเร็ว จนทำให้เน่าเกือบทั้งผล มีสาเหตุจากรา *P.parasitica*

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของ รา *Phytophthora* spp.

2.1 การศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของเส้นใย (ลักษณะโคโลนี) ของเชื้อ ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ การเจริญของเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CA ในตู้บ่มมืดอุณหภูมิ 25^{0}ซ. พบว่าการสร้างเส้นใยบนอาหารแข็ง มีลักษณะการเจริญเป็นเส้นตรง มีกิ่งก้านแยกออกไปไม่สม่ำเสมอ เส้นใยลักษณะใสไม่มีสี ไม่มีผนังกั้นเส้นใย ผิวผนังเส้นใยเรียบ (smooth) ไอโซเลทที่แยกได้จาก โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียนมีลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA คล้ายดอกรักเร่ ไอโซเลทอื่นมีลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหาร PDA คล้ายเส้นใยแมงมุม (arachnoid) ไอโซเลท 49-PR CB 1 S ที่แยกได้จาก หน้ายางพาราเน่า มีเส้นใยฟูมากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ เชื้อเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร CA เมื่ออายุ 5 วัน แต่บนอาหาร PDA เชื้อเจริญเติบโตได้ช้ากว่า เจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุ 7 วัน เชื้อสร้างเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CA หนาแน่นกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่ไอโซเลท 48-An- PhK 1 L สร้างเส้นใยบางที่สุด และเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหาร CA เมื่ออายุ 2 วัน (ตารางที่ 2)

2.2. การศึกษาลักษณะรูปร่างและขนาดสปอร์ของเชื้อ

ผลการศึกษาลักษณะ รูปร่างและขนาดของ sporangium ของ รา *Phytophthora* spp. พบว่า ไอโซเลท 49-PR CB 1 S ที่แยกได้จาก หน้ายางพาราเน่า เชื้อสร้าง sporangia จำนวนมากบนผิวอาหารแข็ง CA เป็นรูปไข่ มีปุ่มนูน (papilla) ชัดเจนบนสปอร์ L : B ratio = 1.5 : 1 สปอร์หลุดจากก้านชูสปอร์ (sporangiophore) ได้ง่ายเมื่ออายุมาก ด้านล่างมี ก้านสปอร์ (pedicel หรือ stalk) ความยาว 5-20 μm ติดอยู่ เช่นเดียวกับ ไอโซเลท แยกได้จาก โรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน ที่สปอร์มีปุ่มนูนที่ปลาย เมื่อสปอร์แก่จะหลุดจากก้านชูสปอร์ พร้อมมีก้าน สั้นๆ ความยาว 2.5 μm ติดอยู่

สปอร์มีรูปร่าง รีๆ L : B ratio = 1.8 : 1 แต่ไอโซเลทอื่น เชื้อสร้าง sporangia น้อย หรือไม่สร้าง sporangia บนผิวอาหารแข็ง CA ต้องตัดชิ้นเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง CA แล้วแช่ในน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ 24-36 ชั่วโมง เชื้อสร้าง sporangia จำนวนมากในน้ำ มี รูปค่อนข้างกลม รูปแพร์หรือกลม มีปุ่มนูนชัดเจนบนสปอร์ L : B ratio = 1.1-1.2 : 1 สปอร์ติดแน่นกับเส้นใย สปอร์ผนังหนา ยกเว้น ไอโซเลท 48-An- PhK 1 L สร้างสปอร์รูปร่างแตกต่างจากทุกไอโซเลท (ตารางที่ 2)

2.3 การศึกษา mating type (แบบคู่ผสม) ของรา *Phytophthora* spp.

ผลการศึกษา mating type (แบบคู่ผสม) ของรา *Phytophthora* spp. โดยการวางเชื้อ unknown และ รา *Phytophthora* spp. มาตรฐานที่ทราบ mating type แล้ว คือ mating type A1 (*P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าลำไย) และ mating type A2 (*P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าแก้วหน้าม้า) โดยวางชิ้นเชื้อคนละด้านในจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อหา mating type ของราทุกไอโซเลท ในครั้งนี้ พบ รา *Phytophthora* spp. จำนวน 8 (9) ไอโซเลท คือ 45 LK Kr B 1 R, 48-Eg-BK-1-F, 47 Pi-Pr K 1 L, 49 Ct Kp 1 R, 48-An- PhK 2 L, 49 An Lpa 1 L, 51 An PB 1 L, 51 MP BK 1 S และไอโซเลทจากทุเรียน เป็น matting type A1 รา *Phytophthora* spp. จำนวน 9 (11) ไอโซเลท คือ 47-Dr-Ph B 1 L, 51 Pl Pb R 1 L, 49-Eg-CM 2 S, 48-Km-BaK 1 S, 49 Km Pb R 1 S, 49 Pi Pb R 1 L, 49-Or Na p 1 L, 47-Or-Pa T 2 L, 46-An-Ba K 1 L, 46-An- NaP 1 L และ 49 An Lpa 2 L เป็น matting type A2 สปอร์ผนังหนาเกิดจากการผสมทางเพศ (oospore) เป็นราที่จะต้องผสมต่างเพศต่างเส้นใย (heterothallic fungus) เพศเมีย (oogonium) เพศผู้ (antheridium) เพศผู้จะอยู่ใต้เพศเมีย (amphigynous antheridium) ส่วนไอโซเลท 49-Or CM 2 L จากกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ และ48-An- PhK 1 L, เป็น homothallic fungus คือ เกิด oospore โดยไม่ต้องผสม ส่วนไอโซเลทที่ไม่พบ mating typeจำนวน 11 ไอโซเลท คือ 49-PR CB 1 S, 49 –PR PB 1 S, 49-Eg-CM 1 F, 49-Eg-CM 3 F, 48-Pi-RY 2 S, 48-Or-Ra Y 1 L, 49-Or CM 3 L, 49-Or CM 4 L, 51 Or Pb R 1 S, 51 Or PB 1 L และ 48-An-Ch B 1 L (ตารางที่ 2)

mating type A1 (*P. palmivora* สาเหตุโรคผลเน่าลำไย) และรา *P. palmivora* มาตรฐาน mating type A2 (*P. palmivora* สาเหตุโรคเน่าแก้วหน้าม้า) จึงใช้รา *P. palmivora* มาตรฐาน 2 ไอโซเลทดังกล่าวในการศึกษา mating type ของ รา *Phytophthora* ในครั้งนี้

ในการศึกษา mating type ผลที่ได้คือ เซลล์สืบพันธุ์ oogonia, antheridia, oospores ซึ่งบางครั้งอาจใช้ประโยชน์จากลักษณะและรูปร่างของเซลล์สืบพันธุ์ เป็นลักษณะอีกลักษณะหนึ่งที่ใช้จำแนกชนิดของ *Phytophthora* ได้ (Waterhouse, 1970) ตำแหน่งของ antheridia อยู่ตรงส่วนไหนของ oogonia ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผิวของ oogonia เรียบ antheridia อยู่ด้านใต้ หรือ ฐานของ oogonia เป็นแบบ amphigynous antheridium ซึ่งเป็นลักษณะประจำของ รา *P. parasitica* (ทวี, 2545) ในการทดสอบครั้งนี้ยังพบ *Phytophthora* ไอโซเลทที่ไม่ผสมกับทั้ง A1 และ A2 อาจ

เนื่องจากเป็น *Phytophthora* ต่างชนิดกันทำให้ไม่สามารถเข้ากันได้ แต่เนื่องจากการทดสอบครั้งนี้ พบ รา *P. parasitica* ทั้ง mating type A1 และ mating type A2 จึงสมควรนำราทั้งสอง mating type มาทดสอบอีกครั้ง เพื่อใช้เป็น mating type มาตรฐานของรา *P. parasitica* ได้

3. **การจำแนกชนิดรา** *Phytophthora* spp.

ผลการจำแนกชนิดราที่นำมาศึกษา โดยเปรียบเทียบ ลักษณะการเจริญของเส้นใย ลักษณะรูปร่างและขนาดของสปอร์ชนิดต่าง ๆ (sporangium, chlamydospores, oogonia, antheridia และ oospores) ของรา *Phytophthora* กับคู่มือการจำแนกชนิด *Phytophthora* ของ Stamps *et al* (1990) และ เอกสารของ Erwin and Ribeiro (1996) และ จำแนกชนิดรา *Pythium* spp. กับคู่มือการจำแนกชนิด *Pythium* ของ PLAATS-NITERINK (1981) และ เอกสารวิชาการ ของ Robertson (1980) พบว่า ไอโซเลท 49-PR CB 1 S ที่แยกจากหน้ายางพารา (จากจังหวัดจันทบุรี) คือรา *P.botryosa* ไอโซเลท 49-Or CM 2 L ที่แยกได้จาก กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ คือ รา *P. heveae* ไอโซเลทที่แยกได้จากรากเน่าโคนเน่าทุเรียน คือ *P. palmivora* และ ไอโซเลท 48-An- PhK 1 L ที่แยกได้จากหน้าวัว คือ รา *Pythium* sp. ส่วนราไอโซเลทอื่น ๆ คือรา *P. parasitica*

รา *P. botryosa* เป็นสาเหตุโรคใบร่วง (leaf fall) และฝักเน่า (pod rot) ของยางพารา ในประเทศมาเลเซีย และไทย ซึ่งเชื้อนี้เป็นสาเหตุของโรคฝักเน่าของโกโก้ด้วย (Erwin and Ribeiro, 1996) สำหรับในประเทศไทยพบการเข้าทำลายบนต้นยางพารา ทำให้เกิดโรคใบร่วง และโรคฝักเน่า และโรคเส้นดำ หรือ เสี้ยนดำ (Black stripe) ที่ทำลายหน้ายางเสมอ ๆ ในแปลงปลูก (อมรรัตน์ , 2551)

รา *P. heveae* มีการรายงานครั้งแรก เมื่อปี ค.ศ. 1929 เป็นสาเหตุโรคเส้นดำ (black stripe) ของยางพารา (*Heveae* rubber) ในประเทศมาเลเซีย ต่อมาพบรายงานการระบาดของรานี้กับพืชหลายชนิดในหลายประเทศ เช่น ประเทศบราซิล ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์และสหรัฐอเมริกา นอกจากนี้มีรายงานการเกิดโรคยอดเน่ายอดด้วนของมะพร้าวในประเทศไอเวอรี่โคสท์ (Erwin and Ribeiro, 1996) อมรรัตน์และคณะ (2550) รายงานครั้งแรกที่พบ รา *P. heveae* บนกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ในประเทศไทย

รา *P. palmivora* เป็นสาเหตุของโรครากเน่า (root rot) โคนเน่า (stem rot) แคงเกอร์ (canker) ใบไหม้ (leaf blight) ยอดเน่า (shoot rot) เหี่ยว (wilt) ผลเน่า (fruit rot) กล้าเน่า (seedling rot) ใบจุด (leaf spot) มีพืชมากกว่า 138 ชนิด ที่เป็นพืชอาศัยของราตัวนี้ พืชที่สำคัญๆ เช่น โกโก้ มะพร้าว ยางพารา พริกไทย สาเก สับปะรด ปาล์มน้ำมัน มะละกอ ทุเรียน มะม่วงหิมพานต์ กล้วยไม้ (อมรรัตน์, 2552)

รา *P. parasitica* เป็นสาเหตุโรคพืชในแหล่งปลูกประเทศต่าง ๆ ในเขตร้อนและกึ่งร้อน สหรัฐอเมริกา อินเดีย ญี่ปุ่น ไต้หวัน อาร์เจนตินา เวนิซูเอลา อิหร่าน อินโดนีเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ เม็กซิโก เมียนม่า ทาสมาเนีย เยอรมันนี บราซิล เปอร์โตริโก เปอร์ตุเกส จาไมก้า และประเทศไทย (ทวี, 2549)

4. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora*

4.1 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora parasitica* ด้วยเทคนิค SSR- PCR ไพรเมอร์ microsatellite

ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายทางพันธุกรรมของรา *Phytophthora* spp. จากพืชอาศัย 6 ชนิด ได้แก่ ยางพารา (จากจังหวัดปราจีนบุรี) สับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ และ ส้ม และ *Pythium* sp. จากหน้าวัว ด้วยเทคนิค SSR-PCR โดย microsattlelite ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการจำแนกรา *Fusarium oxysporum* complex Steenkamp *et al.,* (2005) ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง 220 แถบ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม NTSys 2.22e และวิเคราะห์ค่า bootstrap จำนวนสุ่ม 1000 ครั้ง ด้วยโปรแกรม winboot ค่า bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ค่า bootstrap 85-100% แสดงถึงความเชื่อมั่นสูง ค่า bootstrap 71-84% แสดงถึงความเชื่อมั่นปานกลาง และค่า bootstrap 50-70% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Richardson et al. 2000) Phylogenetic tree แบ่งกลุ่มรา *Phytophthora* spp. ออกจากรา *Pythium* sp. ที่ 30% similarity รา *Phytophthora* spp. จำแนกเป็น 4 กลุ่ม คือ A เป็นรา *P. parasitica* จากยางพารา กลุ่ม B ประกอบด้วยรา *P. parasitica* จากสับปะรด สะระแหน่ กล้วยไม้ และส้ม ด้วยค่า similarity 45-80 % กลุ่ม C เป็นรา *P. haveae* สาเหตุโรคกล้วยไม้รองเท้านารี มีค่า bootstrap เป็น 100% สำหรับรา *P. haveae* เป็นไอโซเลทที่เป็นสาเหตุโรคในพืชยางพารา แต่สามารถเข้าทำลายกล้วยไม้ได้ และมีลักษณะของสปอร์คล้ายกับรา *P. parasitica* ซึ่งจะต้องมีการศึกษาจำแนกโดยใช้คุณสมบัติต่าง ๆ มากขึ้น กลุ่ม D เป็นรา *P. palmivora* สาเหตุโรคกล้วยไม้ และรา *P. parasitica* ไอโซเลทจากกล้วยไม้ จ.ปทุมธานี ซึ่งมีค่า bootstrap สูง 96-97% ดังนั้นมีความเป็นไปได้ในการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่า ไอโซเลท Or-PaT1L อาจเป็นรา *P. palmivora* ได้ (ภาพที่ 1) ทั้งนี้ไม่พบรูปแบบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ชัดเจนกับพืชอาศัยหรือแหล่งปลูกพืช

4.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ รา *Phytophthora parasitica*โดยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอรา *Phytophthora* จากพืชอาศัย 9 ชนิด ได้แก่ ยางพารา (ยางพารา ฉะเชิงเทรา คือจากจังหวัดปราจีนบุรี) กล้วยไม้ หน้าวัว เดหลี หมากผู้หมากเมีย สะระแหน่ ส้ม มะเขือ และลองกอง พบว่าไพรเมอร์ EAC+MAG และ EAG+MAC ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่ไม่ชัดเจน ได้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และแถบดีเอ็นเอที่จาง แต่คู่ไพรเมอร์ EA+MAAC สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน สามารถจำแนกแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) รวม 65 แถบ (ภาพที่ 2) วิเคราะห์ข้อมูลโดยโปรแกรม NTsys 2.22e แบ่งออกได้เป็น 7 กลุ่ม (ภาพที่ 3) ดังนี้ กลุ่ม A มีราไอโซเลทสาเหตุโรคเน่าดำหรือเน่าเข้าไส้กล้วยไม้ 4 ไอโซเลท กลุ่ม B ประกอบด้วยรา สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว 5 ไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลทจากกรุงเทพฯ ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กับไอโซเลทอื่น โดยมีข้อมูลเพิ่มเติมว่าเป็นไอโซเลทที่สามารถก่อให้เกิดโรคได้รุนแรง กลุ่ม C เป็นไอโซเลทจากมะเขือ สะระแหน่ และเดหลี กลุ่ม D เป็นไอโซเลทจากยางพาราและส้ม กลุ่ม E, F และ G เป็นไอโซเลทจากหมากผู้หมากเมีย ลองกอง และหน้าวัว ตามลำดับ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง มีค่า similarity ตั้งแต่ 12-95% แต่สามารถจำแนกราที่เข้าทำลายพืชอาศัยชนิดเดียวกันอยู่ด้วยกันได้ ตัวอย่างคือ กลุ่ม A และ B ที่จัดกลุ่มเชื้อที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชอาศัยของกล้วยไม้และหน้าวัว ตามลำดับ แต่ไอโซเลทของกล้วยไม้จัดกลุ่มอยู่ด้วยกันที่ค่า similarity ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะแยกเก็บจากแหล่งปลูกในจังหวัดเชียงใหม่เช่นเดียวกัน มีการจัดกลุ่มรา *P. parasitica* ในกลุ่มเดียวกับ *P. havaea* ที่ค่า similarity สูงถึง 75% และมีค่า bootstrap สูงถึง 98% โดยมีข้อมูลการจำแนกทางสัณฐานวิทยาว่าเป็นรา *P. haveae* (เป็นไอโซเลทที่เป็นสาเหตุโรคในยางพารา) ทั้งนี้ควรจะต้องมีการจำแนกโดยคุณสมบัติอื่นเพิ่มเติมเพื่อความชัดเจนในการจำแนก species ไอโซเลทของหน้าวัวจากลำปางมีความคล้ายกันสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ similarity แต่ไอโซเลทจากภูเก็ตแตกต่างกัน และไอโซเลทจากกรุงเทพฯ มีความแตกต่างจากไอโซเลทจากแหล่งอื่นๆ ที่ค่า similarity 12 เปอร์เซ็นต์

จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มเชื้อตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSR-PCR ไพรเมอร์ microsatellite ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจน ในขณะที่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP สามารถแสดงความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมกับพืชอาศัย คือพืชอาศัยชนิดเดียวกันจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายกัน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ ศรีสุข และคณะ (2544) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการจัดกลุ่มรา *Phytophthora* โดยสามารถจำแนกราจากทุเรียน 3 ไอโซเลท ที่ความเหมือนกัน 70 เปอร์เซ็นต์ แต่ไอโซเลทจากกล้วยไม้จัดรวมในกลุ่มเดียวกับส้มและพริกไทย ที่ความเหมือนกันเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เทคนิค AFLP นับว่าเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ สามารถใช้ในการศึกษาลักษณะทาง

พันธุกรรม ให้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งในการศึกษาเพื่อการจำแนกชนิดเชื้อรา แบคทีเรีย และพืช

สรุปผลการทดลอง

ผลการสำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคใบไหม้ โรครากเน่า โคนเน่า ผลเน่า จาก 14 จังหวัดทั่วประเทศ แยกเชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เชื้อ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วจำแนกชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบ รา *P. parasitica* จำนวน 29 ไอโซเลท เป็นสาเหตุโรคเน่าของพืชที่ศึกษา และพบ รา *P. heveae* เป็น สาเหตุโรคกล้าเน่าของกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ รา *P. palmivora* เป็น สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน รา *P. botryosa* เป็น สาเหตุโรคหน้ายางพาราเน่า และรา *Pythium* sp. แยกได้จากต้นหน้าวัว

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของราที่แยกได้จากต่างพืชอาศัยและแหล่งปลูกพืช วิเคราะห์จัดกลุ่มเชื้อตามลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSR-PCR ไพรเมอร์ microsatellite ให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างพืชอาศัยหรือแหล่งปลูก แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP บางกลุ่มสามารถแสดงความสัมพันธ์ของลักษณะทางพันธุกรรมกับพืชอาศัย และแหล่งปลูกพืช ไม่พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

ขจรศักดิ์ ภวกุล วิจัย รักวิทยาศาสตร์ มาโนช ทศพล สิริ สุวรรณเขตนิคม. 2542-2543. โรคใบไหม้ของลำไย : ลักษณะอาการ สาเหตุของโรคและการป้องกันกำจัดด้วยสารเคมี. วารสารโรคพืช 14-15 (1-2) : 46-58.

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. โรคของหน้าวัว. ใน คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 72.

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย. กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กทม. 284 หน้า.

ทวี เก่าศิริ. 2545. อนุกรมวิธานรา *Phytophthora* (Taxonomy of Phytophthora). เอกสารประกอบการเรียนการสอนวิชาอนุกรมวิธานรา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 30 หน้า.

ทวี เก่าศิริ. 2549. หน่วยที่ 9 สาเหตุโรคพืช ตอนที่ 9.1 รา และหน่วยที่ 10 ชนิดของโรคพืช ตอนที่ 10.1 โรคพืชที่เกิดจากรา หน้า 9-4 – 9-26และหน้า 10-1-10-34. ใน เอกสารการสอนชุดวิชาศัตรูพืชเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์.

ศรีสุข พูนผลกุล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และ กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2544. การใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เปรียบเทียบวิวัฒนาการของเชื้อรา Phytophthora spp. ไอโซเลทต่าง ๆ และการจัดกลุ่มด้วยการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. ในรายงานการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2546. เตือนภัย...ไฟทอปเธอร่า ลองกอง. กสิกร 76 (4) : 87-93.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2548. โรคผลเน่าในมะเขือม่วง. ข่าวอารักขาพืช 1 (6) : 3.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2551. โรคพืชและการจัดการโรคพืช. หน้า 19-33 *ใน* เอกสารประกอบการฝึกอบรม กลยุทธ์การให้บริการวิชาการเกษตรด้านการผลิตพืช วันที่ 2-4 กรกฎาคม 2551 ณ ห้องประชุมศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตร้อยเอ็ด จ.ร้อยเอ็ด สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 4 อุบลราชธานี กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์. 2552. รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 72 หน้า.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์ และอมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2544. โรครากเน่า-โคนเน่าในสวนทุเรียนภาคตะวันออก. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. ปีที่ 11 เล่มที่ 3. หน้า 39-45.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์และทวี เก่าศิริ. 2546. ความผันแปรใน *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. ทุเรียน : ลักษณะรูปร่างและแบบคู่ผสม. วารสารวิชาการเกษตร 21 (1) : 72-89.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ทวี เก่าศิริ และพัชราภรณ์ ลีลาภิรมย์กุล (2549) โรคราน้ำฝนลำไย. เคหการเกษตร 30 (10) : 90-95.

อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์ ทวี เก่าศิริ และพัชราภรณ์ ลีลาภิรมย์กุล. 2550. การจำแนกชนิดรา *Phytophthora* สาเหตุโรคเน่ากล้วยไม้รองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) จากเชียงใหม่. หน้า 1-17. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี. วันที่ 20-22 พฤศจิกายน 2550. ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ.เมือง จ. พิษณุโลก

Brasier, C. M. and E. M. Hansen, 1992. Evolution Biology of *Phytophthora* Part II : Phylogeny, Speciation and Population Structure. Annu. Rev. Phytopathol. 30 : 137-200.

Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press, St. Paul., MN., USA. 562 p.

Stamps, D.J., G. M. Waterhouse, F. J. Newhook and G. S. Hall. 1990. Revised Tabular Key to the Species of *Phytopthora*. Mycological Papers No. 162. CB. International Mycological Institute. 28 p.

Steenkamp. 2005. Simple sequence repeat markers for species in the *Fusarium oxysporum* complex, Molecular Ecology Notes 5: 622–624

Suzui, T., U. Kueprakone and T. Kamhangridthirong. 1976. *Phytophthora* disease on some economic plants in Thailand. Plant Pathol. Div., of Agr., Thailand. 112 pp.

Waterhouse, G. M. 1970. The genus *Phytopthora* de Bary Commonwealth Mycol. Inst. Kew, Surrey, England. 59 p.

ตารางที่ 1 ไอโซเลทของรา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคพืช จากพื้นที่เพาะปลูกของประเทศไทย (ปี พ.ศ. 2545-2551)

ที่	พืช	ไอโซเลท	อาการ	สถานที่
1	หมากผู้หมากเมีย (Dr=Dracaena Palm)	47[1]-Dr[2]-Ph B[3] 1[4] L[5]	ใบไหม้	เพชรบูรณ์
2	เดหลี (Pl = Peace lily)	51 Pl Pb R 1 L	ใบไหม้	อ.เมือง เพชรบุรี
3	ยางพารา (PR = Para Rubber)	49-PR CB 1 S	หน้ายางเน่า	จันทบุรี (*P.botryosa*)
4	ยางพารา	49 –PR PB 1 S	หน้ายางเน่า	ศูนย์วิจัยยาง ปราจีนบุรี
5	ลองกอง ลูกู LK=Long Kong	45 LK Kr B 1 R	รากเน่า	บ้านนายยวนไทย ต.เขาใหญ่ อ.อ่าวลึก กระบี่
6	ทุเรียน Du = Durian	46-Du-CB 4 S	รากเน่าโคนเน่า	79 ม.2 ต.อ่างคีรี อ.มะขาม จ.จันทบุรี
7	มะเขือ Eg = Egg-plant	48-Eg-Ba K-1-F มะเขือม่วงผลเล็ก	ผลเน่า	ด่านพืชส่งออก ดอนเมือง กรุงเทพ ฯ
8	มะเขือ	49-Eg-CM 1 F มะเขือม่วงผลใหญ่	ผลเน่า	นางอำนวย ใจคำ 43 หมู่ 3 ต. ทุ่งข้าวพวง อ.เชียงดาว เชียงใหม่
9	มะเขือ	49-Eg-CM 2 S มะเขือม่วงผลเล็ก	รากเน่า โคนเน่า	บริษัท ยูเนี่ยนเพลส ต.ทุ่งข้าวพวง อ.เชียงดาว จ.เชียงใหม่
10	มะเขือ	49-Eg-CM 3 F มะเขือยาว	ผล	บ้านปางดะ อ.สะเมิง จ. เชียงใหม่

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ที่	พืช	ไอโซเลท	อาการ	สถานที่
11	สะระแหน่ Km = Kitchen Mint	48-Km-BaK 1 S	ก้าน เน่าดำ ใบไหม้	ร้านแหนมเนือง ดอนเมือง กรุงเทพ ฯ
12	สะระแหน่	49 Km Pb R 1 S	ก้าน เน่าดำ ใบไหม้	แปลงผัก ร้านอาหารแซบอีหลี อ.ชะอำ เพชรบุรี
13	สับปะรด Pi = Pineapple	47 Pi-Pr K 1 L พันธุ์ปัตตาเวีย	โคนใบ (เน่าแห้ง)	กม.5 ปากน้ำปราณ อ.ปราณบุรี ประจวบคีรีขันธ์
14	สับปะรด พันธุ์ปัตตาเวีย	49 Pi Pb R 1 L	โคนใบ (เน่าเละ)	บ้านห้วยทรายใต้ อ.ชะอำ เพชรบุรี
15	สับปะรด พันธุ์ปัตตาเวีย	48-Pi-RY 2 S	แกนก้าน โคนต้นเน่า	แปลงผู้ใหญ่บ้าน ต.มาบยางพร อ.ปลวกแดง จ.ระยอง
16	ส้ม Ct = citrus พันธุ์เขียวหวาน	49 Ct Kp 1 R	รากเน่า	กำแพงเพชร
17	กล้วยไม้หวาย Or = Orchid	48-Or-R Y 1 L	โคนใบเน่า	อ.เมือง จ. ระยอง
18	กล้วยไม้ Mokara	49-Or Na p 1 L	ต้นเน่า ใบเน่า	สุวิทย์ ลิ้มโปเจริญสุข 77/6 ม.1 ต.บางแก้วฟ้า อ.นครชัยศรี นครปฐม
19	กล้วยไม้ รองเท้านารีอินทนนท์ (กล้าเพาะจาก เนื้อเยื่อ)	49-Or CM 2 L	ต้นกล้า ใบ โคนใบเน่า	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ต.หนองควาย อ.หางดง จ.เชียงใหม่ (*P. heveae*)
20	กล้วยไม้รองเท้านารี เหลืองกาญจน์	49-Or CM 3 L	ต้นโต ใบ โคนใบเน่า	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
21	กล้วยไม้เอื้องกุหลาบ กระเป๋าเปิด	49-Or CM 4 L	ต้นเน่า ใบเน่า	ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่
22	กล้วยไม้	47-Or-Pa T 2 L	ใบจุด	อ.เมือง ปทุมธานี
23	กล้วยไม้Mokara	51 Or Pb R 1 S	ต้นเน่า	รังกล้วยไม้วิทยาลัยเกษตรกรรม เพชรบุรี อ.เมือง เพชรบุรี (A1)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ที่	พืช	ไอโซเลท	อาการ	สถานที่
24	กล้วยไม้Vanda	51 Or PB 1 L	ต้นเน่า	รังกล้วยไม้บริษัท PSP อ.เมือง ปราจีนบุรี (นิยมรัฐ) (A2)
25	หน้าวัว An = Anthurium	46-An-Ba K 1 L	ใบไหม้	อ.มีนบุรี กรุงเทพฯ
26	หน้าวัว	46-An- NaP 1 L	ใบไหม้	อ.พุทธมณฑล นครปฐม
27	หน้าวัว	48-An- PhK 1 L	ก้านหน้าวัว	ภูเก็ต 1
28	หน้าวัว	48-An- PhK 2 L	ก้านหน้าวัว	ภูเก็ต 2
29	หน้าวัว	49 An Lpa 1 L	ใบไหม้	ต้นทดสอบพันธุ์ สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จ.ลำปาง
30	หน้าวัว	49 An Lpa 2 L	ใบไหม้	ต้นทดสอบพันธุ์ สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จ. ลำปาง
31	หน้าวัว	51 An PB 1 L	ใบไหม้ เน่า	รังกล้วยไม้บริษัท PSP อ.เมือง ปราจีนบุรี
32	หน้าวัว	48-An-Ch B 1 L	ใบ	อ.เมือง ชลบุรี
33	แพงพวยฝรั่ง Mp = Madagascar periwinkle	51 MP BK 1 S	โคนเน่า	แปลงทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพ ฯ

หมายเหตุ [1]- ปี พ.ศ. ที่เก็บตัวอย่าง

[2]- ชนิดพืชที่เป็นโรค

หมากผู้หมากเมีย	Dr=Dracaena Palm	เดหลี	Pl = Peace lily
ยางพารา	PR = Para Rubber	ลองกอง ลูกู	LK=Long Kong
ทุเรียน	Du = Durian	มะเขือ	Eg = Egg-plant
สะระแหน่	Km = Kitchen Mint	สับปะรด	Pi = Pineapple
ส้ม	Ct = citrus	กล้วยไม้	Or = Orchid
หน้าวัว	An = Anthurium	แพงพวยฝรั่ง (แพงพวยบก)	Mp = Madagascar periwinkle

[3]- จังหวัดที่เก็บตัวอย่างโรค

กรุงเทพฯ	BK = Bangkok	ปทุมธานี	Pa T = Pathumthani
นครปฐม	NaP = Nakhonpathom	ปราจีนบุรี	PB = Prachinburi
ระยอง	Ra Y = Rayong	จันทบุรี	CB = Chanthaburi
เพชรบูรณ์	Ph B = Petchbun	เพชรบุรี	Pb R = Petchburi
ประจวบคีรีขันธ์	Pr K = Prachuapkhirikhan	กระบี่	Kr B = Krabi
ภูเก็ต	PhK = Phuket	กำแพงเพชร	Kp = Kamphaengphet
ลำปาง	Lpa = Lampang	เชียงใหม่	CM = Chiangmai

[4] – ลำดับไอโซเลทที่แยกได้ในจังหวัดนั้น

[5] – ส่วนของพืชที่เป็นโรค

ใบ	L = Leaf	ราก	R = Root
ลำต้น	S = Stem	ผล	F = Fruit

เช่น

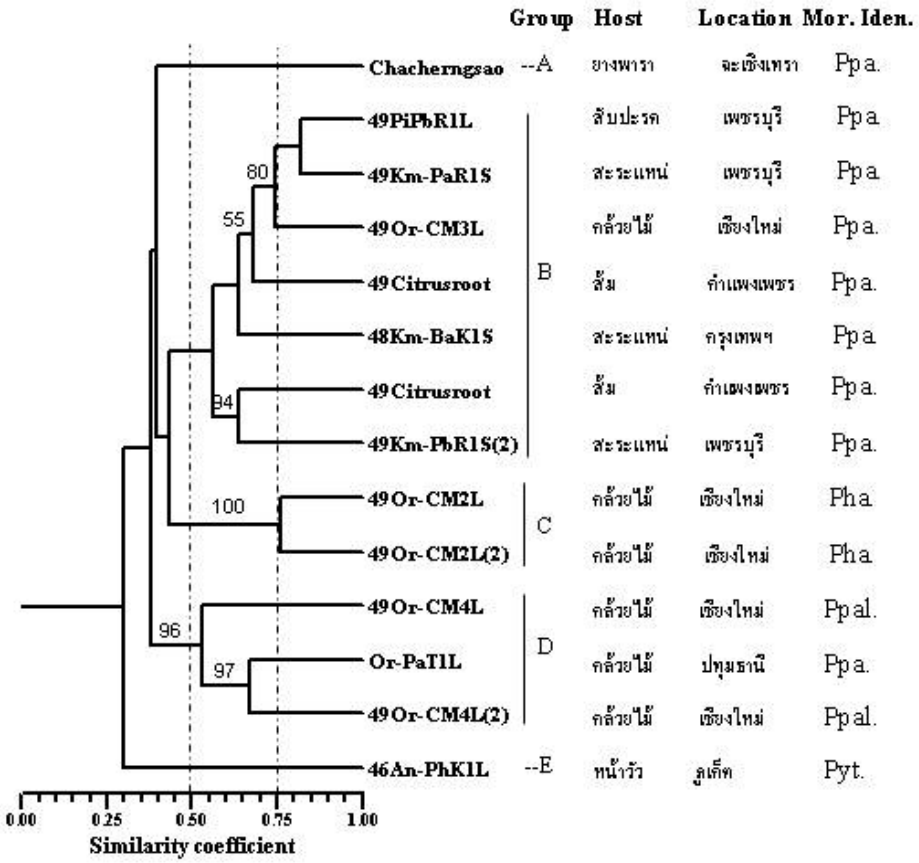
47[1]-Dr[2]-Ph B[3] 1[4] L[5] คือ ไอโซเลท รา *Phytophthora* spp. สาเหตุโรคใบไหม้หมากผู้หมากเมีย เก็บจากจังหวัดเพชรบูรณ์ ไอโซเลทที่ 1 แยกได้จากใบ เป็นต้น

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลทรา *Phytophthora* spp. ที่แยกจากพืชต่างชนิด

ที่	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	L:B ratio ของสปอร์	mating type
1	47-Dr-Ph B 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2
2	51 Pl Pb R 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.1 : 1	A2
3	49-PR CB 1 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม ฟูมากที่สุด	1.5 : 1 (*P.botryosa*)	-
4	49 –PR PB 1 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	-
5	45 LK Kr B 1 R	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A1
6	46-Du-CB 4 S	คล้ายดอกรักเร่	1.8 : 1 *P. palmivora*	A1
7	48-Eg-Ba K-1-F	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.1 : 1	A1
8	49-Eg-CM 1 F	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.1 : 1	-
9	49-Eg-CM 2 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2
10	49-Eg-CM 3 F	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.11 : 1	-
11	48-Km-BaK 1 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2
12	49 Km Pb R 1 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.15 : 1	A2
13	47 Pi-Pr K 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A1
14	49 Pi Pb R 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.17 : 1	A2
15	48-Pi-RY 2 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.1 : 1	-
16	49 Ct Kp 1 R	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A1
17	48-Or-Ra Y 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	-
18	49-Or Na p 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ที่	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	L:B ratio ของสปอร์	mating type
19	49-Or CM 2 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.29 : 1 (*P. heveae*)	homogynous
20	49-Or CM 3 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.12 : 1	-
21	49-Or CM 4 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	-
22	47-Or-Pa T 2 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2
23	51 Or Pb R 1 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.13 : 1	-
24	51 Or PB 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	-
25	46-An-Ba K 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2
26	46-An- NaP 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A2
27	48-An- PhK 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	*Pythium* sp.	homogynous
28	48-An- PhK 2 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.1 : 1	A1
29	49 An Lpa 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.16 : 1	A1
30	49 An Lpa 2 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.17 : 1	A2
31	51 An PB 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.2 : 1	A1
32	48-An-Ch B 1 L	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.14 : 1	-
33	51 MP BK 1 S	คล้ายเส้นใยแมงมุม	1.1 : 1	A1

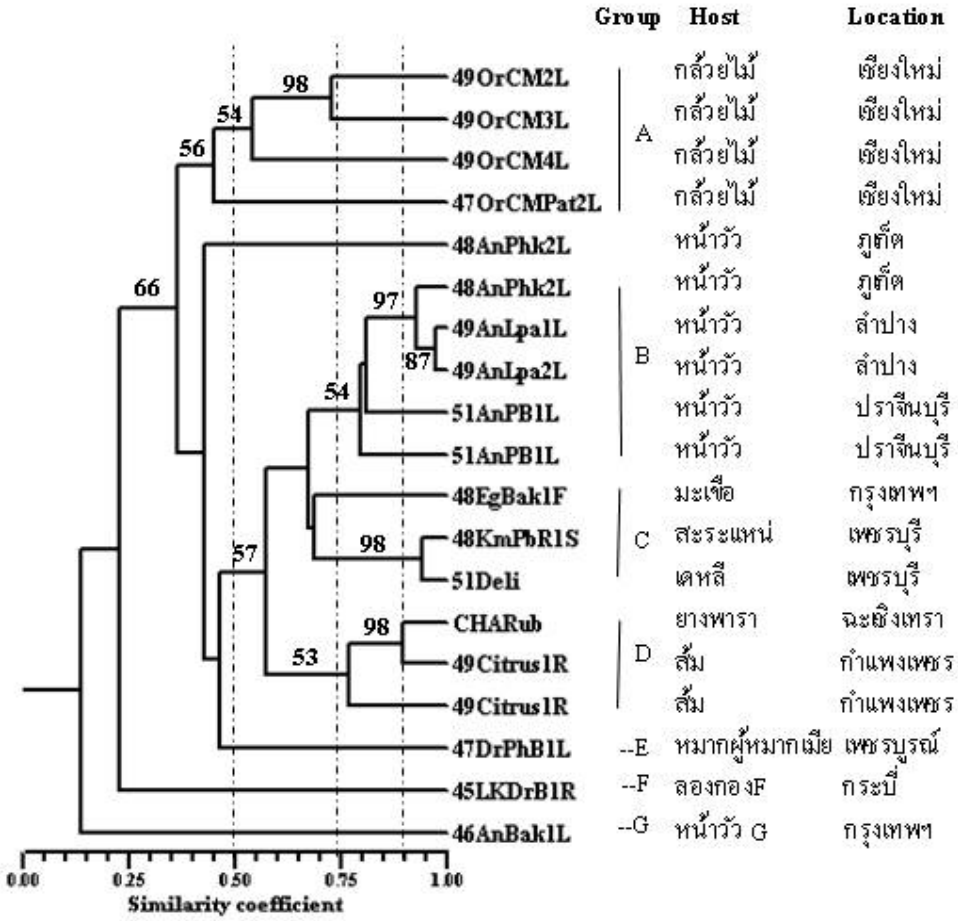


ภาพที่ 1 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมรา *Phytophthora* และ *Pythium* จากพืชอาศัย 6 ชนิด ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สังเคราะห์ด้วย ไพรเมอร์ microsatellite primers (ค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า 50 ไม่ได้นำมาแสดง) วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc. version 2.22e ตัวเลขบนแกนของ tree เป็นค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (ค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า 50 ไม่ได้นำมาแสดง)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

ภาพที่ 2 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รา *Phytophthora* spp. โดยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ E+A/M+AAC ตรวจแถบดีเอ็นเอบน 6% Acrylamide gel ย้อมด้วย Silver nitrate

1. 49 Or-Cm 2 L 2. 49 Or-Cm 3 L 3. 49 Or-Cm 4 L 4. 47 Or PaT 2 L 5. 48 An-PhK 2L
6. 48 An-PhK 2L 7.49 An-Lpa 1 L 8. 49 An-Lpa 2 L 9. 51 An-PB 1 L 10. 51 An-PB 1 L
11. 46 An-BaK 1 L 12. 47Dr-Ph B 1 L 13. 45 LK-Kr B 1 R 14. 48 Eg-BaK 1 F
15. 48 Km-PbR 1 S 16. 51 Deli 17. CHARub 18. 49 Citrus 1 R 19. 49 Citrus 1 R



ภาพที่ 3 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมรา *Phytophthora* จากพืชอาศัย 9 ชนิด ใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP โดยไพรเมอร์ E+A/M+AAC วิเคราะห์ด้วย NTSYS-pc. version 2.22e ตัวเลขบนแกนของ tree เป็นค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง (ค่าวิเคราะห์ที่ต่ำกว่า 50 ไม่ได้นำมาแสดง)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก

DNA Fingerprinting of *Phytophthora capsici*, Causal Agent of Chilli Pepper Blight

ศรีสุข พูนผลกุล[1] ศิริพงษ์ คุ้มภัย[1] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[2]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช [2]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกเพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราในแต่ละแหล่งปลูกและกำหนดขอบเขตของศัตรูพืชกักกัน ดำเนินการเก็บไอโซเลทของเชื้อราจำนวน 15 ไอโซเลท จากแหล่งปลูกพริกของจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย สกลนคร เพชรบูรณ์และหนองคาย ระหว่างปี 2550-2551 การศึกษาในห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตร ปี 2552 โดยการใช้ RAPD primers และ microsattlelite primers 260 สาย เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *P.capsici* และเชื้อราเปรียบเทียบ (*P. palmivora* , *Pythium aphanidermatum*) ผลของการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อราพบว่า primer 56 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้ primer 15 สาย ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ การจำแนกกลุ่มของแถบดีเอ็นเอ ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ *P. capsici* 12 ไอโซเลท จากเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ และสกลนครเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. capsici* 2 ไอโซเลท จากเชียงรายเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท 95 เปอร์เซ็นต์ *P. capsici* จากหนองคาย เหมือนกันกับเชื้อรากลุ่มที่ 1 และ 2 72 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 2 ไอโซเลทเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* ทั้ง 3 กลุ่ม 30 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับความรุนแรงของโรคบนพืชอาศัย

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-01-01-10-50

คำนำ

เชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริกเป็นเชื้อราหนึ่งที่ทำความเสียหายต่อการปลูกพริกในประเทศไทย (ศรีสุข, 2548) มีรายงานความเสียหายของพริกต่อโรคนี้ในประเทศจีน เกาหลี และอินเดียซึ่งเป็นแหล่งผลิตพริกที่สำคัญ (CABI,2003) เชื้อราสามารถติดไปกับผลพริก ลำต้น ใบ และรากของพืชอาศัย และถูกจัดว่าเป็นเชื้อรากักกันพืช มีการศึกษาจำแนกสายพันธุ์ (physiological race)โดยการใช้พืชอาศัย แต่ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการทำให้เกิดโรคและพืชอาศัย
(Polach and Webster,1972)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา 84 ไอโซเลท ด้วยการใช้ isozyme พบว่าแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากพืชตระกูลมะเขือ พืชตระกูลแตง พริกไทย และโกโก้ กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากพืชเขตร้อน ได้แก่ พริกไทย มะละกอ มะคาดาเมียและยางพารา และเชื้อราจากรัฐฮาวายในสหรัฐอเมริกา กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อราที่แยกจากโกโก้ของประเทศบราซิล (Oudemans and Coffey, 1991) การศึกษาเชื้อรา *P. capsici* ที่แยกได้จากพริกด้วยการใช้เทคนิค RFLP สามารถจัดกลุ่มของแถบดีเอ็นเอออกได้ 4 กลุ่ม (Hwang *et al*., 1991) ในประเทศไทยมีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรานี้ด้วยการใช้พืชอาศัยมาตรฐาน 11 สายพันธุ์ (differential hosts) พบว่าเชื้อรานี้เป็น pathotype ที่ 3 (ศรีสุข, 2550) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* ครั้งนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการพิจารณาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่แยกได้ในแต่ละแหล่งปลูกของประเทศสำหรับกำหนดขอบเขตของศัตรูพืชกักกัน และเพื่อใช้เป็นหลักฐานอ้างอิงสำหรับการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่จะมีการพัฒนาขึ้นจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อรา *Phytophthora capcisi* 15 ไอโซเลท จากจังหวัด เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ หนองคาย สกลนคร และเชียงราย
2. เชื้อรา *P. palmivora* 2 ไอโซเลท (แยกได้จากรากส้มจังหวัดสมุทรสาคร และรากทุเรียนจังหวัดจันทบุรี)
3. เชื้อรา *Pythium aphanidermatum* สาเหตุโรคลำต้นเน่าของพริกที่แยกเชื้อได้จากต้นพริกในแหล่งปลูกจังหวัดนครราชสีมา
4. RAPD primers, microsattlelite primer (Univerity of British Columbia, Canada,ชุด 1 และ ชุด 9) จำนวน 200 primers และ Operon primers จำนวน 60 primers

5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช

6. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ

วิธีการ

รวบรวมต้นพริกที่แสดงอาการลำต้นไหม้จากแหล่งปลูกพริก อำเภอแม่ริม และ อำเภอสันทรายจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอพรรณานิคม จังหวัดสกลนคร อำเภอเมือง และ อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย และ อำเภอเมือง จังหวัดหนองคาย ซึ่งมีการระบาดของโรคและแยกเชื้อรา *P. capsici* บริสุทธิ์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (RNV) ตรวจสอบความสามารถในการทำให้พริกเป็นโรคและ สายพันธุ์ของเชื้อราโดยใช้พันธุ์พริกทดสอบ 9 พันธุ์ ได้แก่ CM 334,PI 201232, CM 331, CNPH 703, PI 201238, PI 201234,, PI 189550, Early calwonder และ PB 602 เพื่อใช้เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างได้ในภายหลัง

แยกเชื้อรา *P. palmivora* บริสุทธิ์จากรากส้มที่เก็บจากจังหวัดสมุทรสงคราม และ จากรากทุเรียนที่เก็บจากจังหวัดจันทบุรีด้วยวิธีการเดียวกับการแยกเชื้อรา *P. capsici*

แยกเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* บริสุทธิ์จากรากพริกที่เก็บจากจังหวัดนครราชสีมาด้วยวิธีการเดียวกับการแยกเชื้อรา *P. capsici*

เพิ่มปริมาณเส้นใยของเชื้อราทั้ง 18 ไอโซเลท ด้วยอาหารเหลว V-8 เป็นเวลา 14 วัน กรองเส้นใย ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อหลาย ๆ ครั้ง ผึ่งเส้นใยให้แห้ง นำไปบดให้เป็นผงละเอียด

นำผงของเส้นใยไปสกัดดีเอ็นเอด้วยการใช้วิธีการสกัดของ Murray and Thompson (Murray and Thompson, 1980) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล แอลกอฮอร์ 70% เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ในสารละลาย TE และนำไปเก็บในตู้ปรับอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

นำดีเอ็นเอที่เก็บรักษาไว้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องอ่านความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอต้นแบบที่ 25 นาโนกรัม เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (thermal cycler, Perkin-Elmer 9700) โดยใช้ RAPD primer ชนิด 10 bases จำนวน 160 สาย (UBC primers ชุด 1 และ Operon primers) และ microsattlelite primer จำนวน 100 สาย (UBC primers ชุด 9) โปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้ที่อุณหภูมิของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 40 รอบ ต่อจากนั้นเพิ่มสายดีเอ็นเอต่อที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เก็บผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ไปตรวจผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งมีความเข้มข้นของ agarose ที่ 1 % ในสารละลาย ethidium bromide ถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพ นำภาพถ่ายดีเอ็นเอที่ปรากฏไปนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ คำนวณข้อมูล

แถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NYSYS.PC ผลจากการคำนวณได้ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต้องการ เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างได้กับข้อมูลเบื้องต้นของสายพันธุ์เชื้อรา *P. capsici* ที่ได้จากการเกิดโรคบนพันธุ์พริกทดสอบ

ระยะเวลาการดำเนินงานและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลา ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ กลุ่ม วิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างเชื้อรา *P. capsici* สาเหตุของโรคลำต้นไหม้ จังหวัดเชียงใหม่ หนองคาย สกลนคร เพชรบูรณ์ และเชียงราย ได้ 10, 1, 1, 1 และ 2 ไอโซเลท ตามลำดับ รวม 15 ไอโซเลท ตรวจสอบความสามารถในการทำให้พริกเป็นโรคพบว่าเชื้อรา 10 ไอโซเลท เชียงใหม่ทำให้พริกพันธุ์จินดาเป็นโรครุนแรงระดับ 4 เชื้อราไอโซเลทเพชรบูรณ์ ทำให้พริกพันธุ์จินดาเป็นโรคปานกลางระดับ 3.5 เชื้อรา 4 ไอโซเลทจากจังหวัดเชียงราย หนองคายและสกลนคร ทำให้พริกพันธุ์จินดาเป็นโรคต่ำระดับ 2.5

เมื่อใช้ RAPD primers และ microsattlelite primer จำนวน 260 สาย ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อรา และปฏิบัติได้ผลเช่นเดียวกัน 3 ครั้งการทดลอง พบว่า primer 56 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* ได้ แต่ primer เพียง 15 สาย ที่ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ นำแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันไปคำนวณด้วยโปรแกรม NYSYS.PC ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อรา *P. capsici* ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยพบว่าเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท จากจังหวัดเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ และสกลนครมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์กลุ่มที่ 2 เชื้อรา *P. capsici* 2 ไอโซเลท จากจังหวัดเชียงรายเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท ในกลุ่มที่ 1 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อรา *P. capsici* จากจังหวัดหนองคาย มีความเหมือนกันกับเชื้อรากลุ่มที่ 1 และ 2 72 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 2 ไอโซเลทมีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici*ทั้ง 3 กลุ่มเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเชื้อรา *Pythium aphanidermatum* จากจังหวัดนครราชสีมามีความแตกต่างกับเชื้อรา *P. capsici* และเชื้อรา *P. palmivora* อย่างมาก โดยพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มเพียง 25 เปอร์เซ็นต์

การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท จาก 5 แหล่งปลูก ที่สร้างได้นี้กับความสามารถของการทำให้พริกเกิดโรค พบว่าเชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้

เกิดโรคสูง(จากจังหวัดเชียงใหม่) เชื้อราที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่ำ (จากจังหวัดเชียงราย) ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกัน และเชื้อรา ยกเว้นเชื้อรา *P. capsici* ไอโซเลทเพชรบูรณ์ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคระดับปานกลาง ระดับ 3.5 และเชื้อรา รา *P. capsici* ไอโซเลทสกลนคร ที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่ำระดับ 2.5 ถูกจัดไว้ในกลุ่มที่แสดงความสามารถในการทำให้เกิดโรครุนแรงระดับ 4 สำหรับเชื้อรา รา *P. capsici* ไอโซเลทหนองคายที่มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคต่ำระดับ 2.5 ไม่ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกับเชื้อราไอโซเลทอื่น ๆ ผลการศึกษานี้พบว่าการจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับความรุนแรงของโรคบนพืชอาศัย

สรุปผลการทดลอง

โรคลำต้นไหม้ของพริกเกิดจากเชื้อรา *Phytophthora capsici* จำนวน 15 ไอโซเลท จากแหล่ง

ปลูกพริกของจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย สกลนคร เพชรบูรณ์และหนองคาย จำแนกสายพันธุ์ด้วยพืชทดสอบ 11 ชนิดพบว่าเป็น Pathotype ที่ 3 มีความรุนแรงของโรคบนพริกพันธุ์จินดาวัดได้ระดับ 4 (รุนแรงมาก) เมื่อใช้ RAPD primers และ microsattlelite primer จำนวน 260 สาย และ ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอของเชื้อราพบว่า primer 56 สาย เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *P. capsici* ได้ primer 15 สาย ให้ผลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ การจำแนกกลุ่มของแถบดีเอ็นเอ ได้ 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1คือ *P. capsici* 12 ไอโซเลท จากเชียงใหม่ เพชรบูรณ์ และสกลนครเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 2 เชื้อรา *P. capsici* 2 ไอโซเลท จากเชียงรายเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* 12 ไอโซเลท ในกลุ่มที่ 1 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อรา *P. capsici* จากหนองคาย เหมือนกันกับเชื้อรากลุ่มที่ 1 และ 2 72 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *P. palmivora* ทั้ง 2 ไอโซเลทเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อรา *P. capsici* ทั้ง 3 กลุ่ม 30 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สอดคล้องกับความรุนแรงของโรคบนพืชอาศัย

เอกสารอ้างอิง

ศรีสุข พูนผลกุล 2548. โรคลำต้นไหม้ของพริกที่พบระบาดใหม่ ข่าวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 ตุลาคม 2548

ศรีสุข พูนผลกุล และ ศิริพงษ์ คุ้มภัย 2550. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Phytophthora capsici* สาเหตุโรคลำต้นไหม้ของพริก. การประชุมวิชาการอารักขาพืชครั้งที่ 8. 20-22 พฤศจิกายน 2550 พิษณุโลก

CAB International, 2003. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK: CAB International

Hwang, B.K., A.W.A.M.de Cock, G. Bahnweg, H.H.Prell and R. Heitefuss. 1991.Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Phytophthora capcisi* isolates from pepper (*Capsicum annuum*). Syst. Appl. Microbiol. 14:111-116.

Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nuc. Acid. Res. 8 : 4321-4325.

Polach, F.T. and R.K. Webster. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capcisi* . Phytopathology. 62:20-26.

Oudemans , P. and M.D.Coffey, 1991. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. Mycol. Res. 95: 1025-1046.

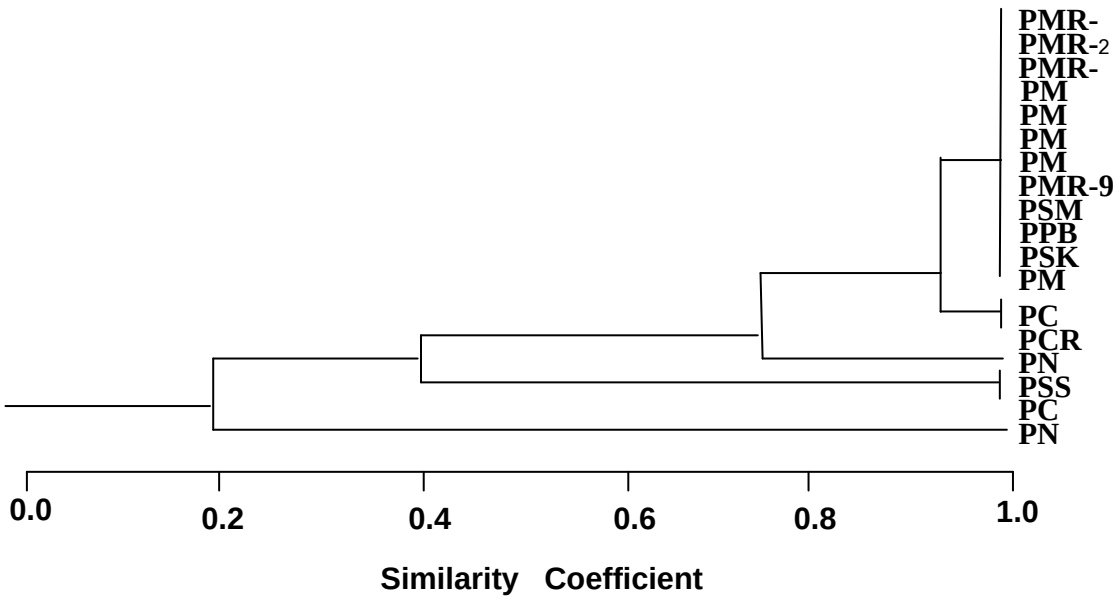


Fig. 1 Phylogenetic tree of 16 isolates of *Phytophthora capsici* and 2 isolates of *P. palmivora* constructed with RAPD data by using NTSYS.PC program [*P. capsici* isolates; PMR = MaeRim, Chiangmai ; PSM = Sansai , Chiangmai; PSK = Sakonnakorn; PPB = Petchaboon; PCR = Chiangrai ; PNK = Nongkai , *P. palmivora* isolates; PSS = Samutsakorn (from tangarine) ; PJB = Chantaburi (from durian) PNR= *Pythium aphanidermatum* isolates from Nakornrachasima.

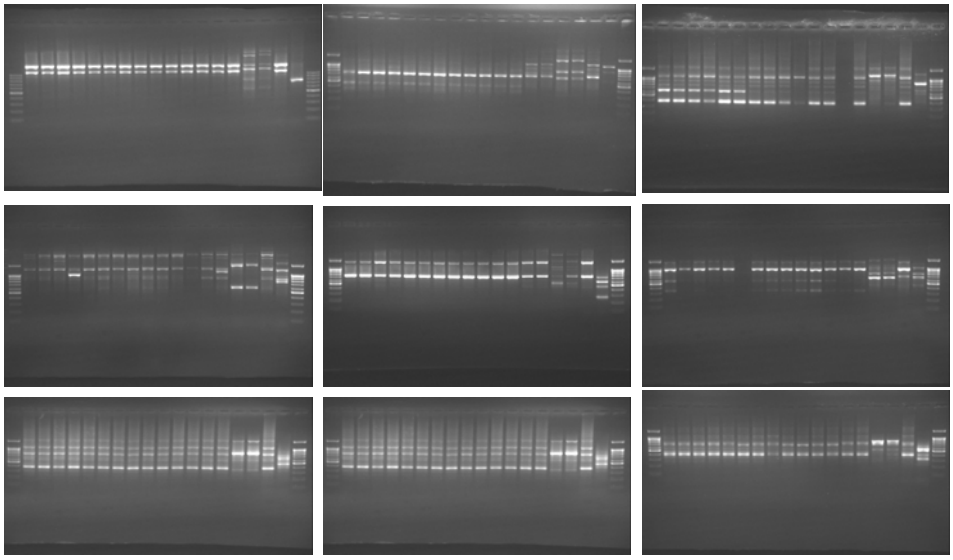


Fig. 2 Random amplified polymorphic DNA(RAPD) profiles of amplification with primers UBC

(Univerity of Britich Columbia) 848, 856,858,866,868,873,884,889. and 891 *Phytophtora capsici* Lane 1-9= from MaeRim, Chiangmai, Lane 10 = from Sansai, Chiangmai; Lane 11-12 = from Sakonnakorn, Petchaboon; Lane 13-14 = Chiamgrai; Lane 15-16 *P. pamivora;* Lan17= *Pythium aphanidermatum* Lane 18 = Nongkai. Molecular marker : 100 bp ladder.

การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้มโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antiserum production of causal agent of citrus greening disease using bacterial cell system

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ดารุณี ปุญญพิทักษ์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

แยกสกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบของแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง โดยใช้ CTAB buffer แล้วนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีน outer membrane protein ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้ม ได้แก่ OMP1 Stu และ OMP2 Stu สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 996 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pTrcHis2-TOPO) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมเข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีขนาด 996 คู่เบส จากนั้น subclone ยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1128 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส คัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 41 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปผ่าน Ni-NTA column แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือด 6 ครั้ง ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้ ด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า microwell plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด และอัตราใบพืช : coating buffer 1:5 และความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 500 ให้ผลได้ดี สามารถนำไปปรับใช้ตรวจโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มต่อไปได้

รหัสการทดลอง 09 01 49 02 03 04 02 49

คำนำ

โรคกรีนนิ่ง (greening disease) หรือโรคใบเหลืองต้นโทรม จัดเป็นโรคสำคัญที่ทำความเสียหายให้กับธุรกิจการปลูกส้มของประเทศไทย โดยเนื้อใบมีสีเหลือง แต่เส้นใบยังมีสีเขียวอยู่ ซึ่งคล้ายกับอาการที่เกิดจากการขาดธาตุสังกะสี ผลมีขนาดเล็กและบิดเบี้ยว ถ้าเป็นโรครุนแรงใบมีขนาดเล็ก หนา และต้นทรุดโทรม มีรายงานว่าโรคนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่สามารถเลี้ยงหรือเจริญเติบโตในอาหารสังเคราะห์ได้ จัดอยู่ใน alpha subdivision *Proteobacteria* มี 2 สายพันธุ์คือ *Candidatus* Liberibacter asiaticus ซึ่งทนร้อน (heat tolerant strain) มีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (*Diaphorina citri*) เป็นพาหะโดยทั่วไปพบในทวีปเอเชีย และ *Candidatus* Liberibacter africanus เป็นสายพันธุ์ที่ไวต่อความร้อน (heat sensitive strain) และมีเพลี้ยไก่แจ้ (*Trioza erytreaei*) เป็นพาหะแพร่ระบาดในทวีปอัฟริกา (ไมตรี, 2540; Murray and Schleifer, 1994) การตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคนี้มีหลายวิธี เช่น โดยติดตาทาบกิ่งบนพืชที่อ่อนแอต่อโรค หรือโดยการตรวจหาอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แต่ต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนานนับเดือน ปัจจุบันเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาเป็นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคนี้ เพราะ เป็นวิธีที่แม่นยำ ประหยัด รวดเร็วและสามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชได้เป็นจำนวนมาก (Chippindall and Whitlock, 1989; Ohtsu *et al.,* 1995) แต่ไวรัสที่สกัดได้มีปริมาณน้อย ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการผลิตแอนติซีรัม ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถผลิตโปรตีนต่างๆในเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากได้ และมีความบริสุทธิ์สูง เป็นการเพิ่มปริมาณแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองต่อไป

แอนติซีรัมของเชื้อสาเหตุ (greening organism, GO) ของโรคกรีนนิ่งส้ม มีรายงานว่าสามารถผลิตจากเส้นกลางใบของส้มหรือแพงพวยที่เป็นโรค เช่น ในประเทศแอฟริกาใต้มีการแยกเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งแบบกึ่งบริสุทธิ์จากส้ม โดยใช้เอนไซม์ช่วยแยก sieve tube ซึ่งมีเชื้อออกจากเนื้อเยื่อส่วนอื่นของพืชและผลิตแอนติซีรัม ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งโดยวิธี ELISA และ immuno-blot assays (Chippindall & Whitlock, 1989) Villechanoux และคณะ (1990) ได้แยกเชื้อ GO (Poona strain) จากแพงพวยที่เป็นโรคโดยใช้วิธี affinity chromatography กับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (10A6 strain) และพบอนุภาคของเชื้อสาเหตุทั้งแบบท่อนยาว (1-4 X 0.15-0.3 ไมครอน) และแบบทรงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 ไมครอน แต่ยังไม่มีการนำไปผลิตแอนติซีรัม C.Ke และคณะ (1993) ได้แยกเชื้อ GO จากแพงพวยและผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดี แต่มีคุณภาพต่ำทำให้การวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อโดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาไม่แม่นยำ Ohtsu และคณะ

(2002) ได้ทดสอบเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณเชื้อ GO ในแพงพวย สำหรับนำมาใช้เป็นแหล่งของ GO ในการแยกเชื้อกึ่งบริสุทธิ์ และใช้เอนไซม์ cellulase และ macerozyme ในการแยกเนื้อเยื่อที่มี GO ออกจากเนื้อเยื่อพืชส่วนอื่น แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งได้แต่ต้องใช้ตัวอย่างพืชในการทดสอบในปริมาณค่อนข้างสูง

Druka และคณะ (1996) รายงานการผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นของ coat protein ยีนจากสายพันธุ์ข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ โดยนำมาโคลนเข้า vector แล้วนำไปเชื่อมกับ MBP fusion proteinsจากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจวินิจฉัยไวรัสใบสีส้มรูปทรงกลมได้โดยวิธี ELISA, Western blotting และ IEM นอกจากนี้ ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรค ฉะนั้นควรพัฒนาวิธีการผลิตแอนติซีรัมของ GO โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ การเพิ่มปริมาณโปรตีนของเชื้อในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่าย เพราะในปัจจุบันยังไม่มีแอนติซีรัมของ GO ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นส้มและแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง
2. ไพรเมอร์
3. พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนยีน
5. กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

วิธีการ

1. การโคลนยีน outer membrane protein (*omp*)

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome

ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 7 สาย จากส่วนของยีน outer membrane protein (*omp* gene) ของเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งของประเทศไทย (OMP-TH) ซึ่งเป็น

แบคทีเรียแกรมลบ เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector

1.2 การแยกสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ

นำตัวอย่างแพงพวยที่ได้รับการปลูกเชื้อสาเหตุของโรค มาแยกสกัดดีเอ็นเอ โดยตัดเฉพาะเส้นกลางใบ นำมาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด จากนั้นเติม CTAB buffer ในอัตรา 0.1 กรัม/1มิลลิลิตร บ่มสารละลายใน water bath ที่ 65 °C นาน 10 นาที แล้วนำไปแยกออกจากเนื้อเยื่อพืชด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (15,000 รอบต่อนาที, 10 นาที) ที่ 4 °C จากนั้นเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ในส่วนน้ำใสที่แยกได้ ในอัตรา 1:1 เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที, 10 นาที นำส่วนของน้ำใสด้านบนของหลอดทดลองมาผสมกับ isopropanol ในอัตรา 1:1 แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล 500 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ก่อนนำมาทำให้แห้งที่ 37 °C จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °C

1.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และการโคลนยีน

นำดีเอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ OMP1 Stu (5’ AGG CCT GAA GTT GAT AAG GGT ATG GGC GTA GAA GGG 3’) และ OMP2 Stu (5’ AGG CCT CTA CAT GCG ATT ACC TAT ACG AAA ACC AAA 3’)

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

10 X PCR buffer	5.0	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	2 .0	ไมโครลิตร
20 uM Primer OMP 1 Stu	1.0	ไมโครลิตร
20 uM Primer OMP 2 Stu	1.0	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	1.0	ไมโครลิตร
Template	1.0	ไมโครลิตร
dH_2O	38.0	ไมโครลิตร
รวม	50.0	ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยา PCR รวม 32 รอบ ดังนี้

1. 94 °ซ 5 นาที 1 รอบ
2. 94 °ซ 45 วินาที, 65 °ซ 45 วินาที, 72 °ซ 45 วินาที 30 รอบ
3. 72 °ซ 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.4 การต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

นำ PCR product (10-20 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ที่แยกได้จาก PCR High Pure Column ปริมาตร 0.5-4.0 ไมโครลิตร ผสมกับ โคลนนิ่งเวคเตอร์ pTrcHis2-TOPO (Invitrogen, เป็น cloning & transformation Kits) 1 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรรวม 5 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นดูดมา 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดของ One Shot® cell แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 30 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติมอาหาร SOC ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ 37°C นาน 30 นาที ดูดมา 50 ไมโครลิตร และเทแผ่ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

1.5 การสกัดโคลนของพลาสมิด ออกจากเซลล์ของ *E. coli* โดยวิธี Alkaline lysis

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 150 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) 150 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วย หนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ

และเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2 % ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที

นำพลาสมิดที่สกัดได้มาตรวจดูขนาดของพลาสมิดและส่วนของยีน *omp* ที่โคลนเข้าไป บน 1% agarose gel electrophoresis จากนั้นนำโคลนมาตัดด้วย เอ็นไซม์ *Eco*R I (1 ยูนิคของ *Eco*RI/ 1ไมโครกรัมของ พลาสมิด) และตรวจสอบซ้ำด้วยเทคนิค PCR ใช้ ไพรเมอร์ OMP1 Stu และ OMP2 Stu ก่อนนำไป sequence เพื่อหาลำดับเบสของ ยีน *omp* ด้วยเครื่อง Sequencer

1.6 การ Subclone ยีน outer membrane protein (*omp*)

หลังจาก subclone ยีน *omp* ขนาด 856 คู่เบส เข้าสู่ pGEX-2T(Amersham) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 4.9 กิโลเบส) ที่ตำแหน่ง *Bam*H I-*Sac* I พบว่ามี 2 โคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* (Rosetta strain) และผลจากการตรวจสอบโดยวิธี SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 59 กิโลดาลตัน แต่เมื่อนำไป purify โปรตีน ปรากฏว่า ได้ปริมาณโปรตีนน้อยมาก จึงได้ทำ subclone ใหม่ โดยนำพลาสมิดที่สกัดได้ (pTrcHis2-TOPO, Invitrogen) มาทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ Lumi_OMPF 5’ CA CCGAAGTTGA TAAGGGTATG GGCG 3’ และ Lumi_OMPR 5’ CTACATGC GATTACCTAT ACGAAAACC 3’ และใช้ Deep Vent DNA Polymerase (Proof reading) แทน *Taq* Polymerase เพื่อให้ได้ PCR Product ที่เป็น blunt ends โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

dNTPs (10 mM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_OMPF (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_OMPR (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Deep Vent DNA Polymerase	1.0	ไมโครลิตร
Buffer	1.0	ไมโครลิตร
template	1.0	ไมโครลิตร
dH_2O	19.0	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ DNA ตาม program ดังนี้ ทำปฏิกิริยา PCR รวม 32 รอบ ดังนี้

1. 94 °ซ 5 นาที 1 รอบ
2. 94 °ซ 1 นาที, 58 °ซ 1 นาที, 72 °ซ 1 นาที จำนวน 30 รอบ
3. 72 °ซ 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

นำ PCR product นำมาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) และถ่ายเข้าสู่ (transformation)เข้า *E. coli* Top 10 โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่ (ขั้นตอนเหมือนข้อ 1.5) ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *omp* ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 % ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ จากนั้นแล้วเติม 2xSDS-PAGE sample buffer (0.125 Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue R250, 5% β-Mercaptoethanol)

50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *omp* หลังจากลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4°ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B : 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM Tris-HCl (MW.=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (4 °ซ) เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้ว ด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวนปริมาณโปรตีนที่ผ่าน column โดยใช้สูตรของ Bradford's

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อๆไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1สัปดาห์อีก 5 ครั้ง นำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4 °C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °ซ จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอด

แอนติเจน (recombinant protein 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T buffer (PBS + 0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วนำมาเติมด้วย Blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 6 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1: 10 ถึง 1:1,000,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphstase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ทีค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้ม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำเส้นกลางใบของส้มที่เป็นโนโรคกรีนนิ่งและส้มปกติ มาบดใน coating buffer ในอัตรา 1 กรัม : 5, 10 , 15 มิลลิลิตร หยอดน้ำคั้นพืชลงในหลุมของไมโครเพลท (microplate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1-2 ชั่วโมง แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1: 2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิไลซา (ELISA Reader) โดยมีการเปรียบเทียบชนิดของเพลท 2 ชนิด ได้แก่ microplate ของ Nunc และ ELI/RIA Plate ขอ งCostar

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2548 - กันยายน 2552
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีน outer membrane protein (*omp*)

ไพรเมอร์ จำนวน 7 สาย ที่ออกแบบจากส่วนของยีน outer membrane protein (*omp* gene) ของเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งของประเทศไทย (OMP-TH) (ภาพที่ 1) เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector ได้แก่

OMP1 Stu (5' AGG CCT GAA GTT GAT AAG GGT ATG GGC GTA GAA GGG 3')

OMP2 Stu (5' AGG CCT CTA CAT GCG ATT ACC TAT ACG AAA ACC AAA 3')

OMP3N (5' GGATCCTATTTTTTAGGGAGTCCTA 3')

OMP4N (5' GAGCTCATAATTCGAACTCACTGAG 3'

OMP6C (5' GAGCTCCATGCGATTACCTATACGA 3')

OMP7Strep (5' ATGGTAGGTCTCAGCGCCTATTTTTTAGGGAGTCCTATATCCG 3')

OMP8Strep (5' ATGGTAGGTCTCATATCACATGCGATTACCTATACGAAAACC 3')

การเลือกยีน *omp* เพื่อใช้ในการโคลนเข้าสู่พลาสมิดเวคเตอร์ (cloning nvector และ protein expression vectors) สำหรับผลิตและเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง เพราะเป็นยีนที่อยู่บนเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อมภายนอกและความสามารถในการเกิดโรค (Bastianel *et al*., 2005)

ปริมาณดีเอ็นเอ ของใบแพงพวยที่เป็นโรคและใบปกติที่ได้จากการสกัด และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ OMP1 Stu และ OMP1 Stu จากการตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย agarose gel electrophoresis พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 996 คู่เบส (bp) ในใบพืชที่เป็นโรค (ภาพที่ 2)

การตรวจสอบว่าโคลนต่างๆของพลาสมิด pTrcHis2-TOPO หลังต่อเชื่อมกับ PCR product (996 คู่เบส) และtransform เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH 5α) และนำโคลนที่มีดีเอ็นเอขนาด 996 คู่เบส ไปตรวจหาลำดับเบสของยีน *omp* ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *omp* (ภาพที่ 3)

- ผลการ Subclone ยีน outer membrane protein (*omp*) หลังจาก subclone ยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 5.8 กิโลเบส) (ภาพที่ 4) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1128 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส (ภาพที่ 5) จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ

ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดเมื่อปล่อยให้เกิดการชักนำข้ามคืน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41 กิโลดาลตัน ซึ่งมีค่าเท่ากับปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ พลาสมิดสายผสม (41.3 กิโลดาลตัน) (ภาพที่ 6)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 41 กิโลดาลตันตั้งแต่ fraction ที่ 3-13 (F3-F13) แต่มีปริมาณโปรตีนสูงตั้งแต่ F7-F10จึงเก็บน้ำใสของ F4-F11 มารวมกัน และจากการคำนวนหาปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ พบว่ามีปริมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งนำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่น และเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80°ซ ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 6 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:10 ถึง 1:1,000,000 พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชตระกูลส้ม โดยเปรียบเทียบชนิดของ plate พบว่า microwell plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีกว่า ELI/RIA Plate ของ Costar ซึ่งให้ปฏิกิริยาเป็นสีเหลืองทุกหลุม ทำให้ไม่สามารถอ่านผลความแตกต่างระหว่างส้มเป็นโรคและส้มปกติได้ จากการตรวจสอบประสิทธิภาพในการ

ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้ม พบว่าอัตราใบพืช : coating buffer 1:5 และความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 500 ให้ผลได้ดีกว่า อัตราใบพืช : coating buffer 1:10 และ 1:15 และ ความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 1000

สรุปผลการทดลองและข้อแนะนำ

ใช้เส้นกลางใบของแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง มาแยกสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ CTAB buffer ในการบดตัวอย่าง แล้วนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีน outer membrane protein ของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งส้ม ได้แก่ OMP1 Stu และ OMP2 Stu สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 996 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pTrcHis2-TOPO) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี หลังจากนั้นใช้ไพรเมอร์ OMP3N และ OMP6C เพิ่มปริมาณ OMP โปรตีนจาก pTrc-996-OMP ซึ่งสังเคราะห์ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 856 คู่เบส และจากการ subclone ยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) ซึ่งเป็น protein expression vector (ขนาด 5.8 กิโลเบส) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1128 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีน *omp* ขนาด 996 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส จากนั้นคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 41 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปผ่าน Ni-NTA column ได้โปรตีนที่มีขนาด 41 กิโลดาลตัน ใน fraction ที่ 3-13 และมีปริมาณ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ได้จากการคำนวณโดยใช้สูตร Bradford แล้วนำโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณคอของกระต่าย โดยผสมกับ Freund's adjuvant ทุก 2 สัปดาห์ รวม 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดเพื่อแยกแอนติบอดีออกมาจากเม็ดเลือดแดง ทดสอบไตเตอร์ของแอนติบอดีจากการเจาะเลือดแต่ละครั้ง พบว่า แอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่4-6 มีไตเตอร์สูงสุด คือ พบว่า แอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-6 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างพืชตระกูลส้ม พบว่า microwell plate ของ Nunc ให้ปฏิกิริยาดีที่สุด และอัตราใบพืช : coating buffer 1:5 และความเข้มข้นของแอนติซีรัม 1: 500 ให้ผลได้ดี สามารถนำไปปรับใช้ตรวจโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

ไมตรี พรหมมินทร์. 2540. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของส้ม เอกสารวิทยาการส้มทางเลือกปัจจุบันสู่อนาคต สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ร่วมกับศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7-11 กรกฎาคม 2540 ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ 16 หน้า.

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547.หน้า 110-117.

Bastianel, C., M. Garnier-Semancik, J. Renaudin, J.M. Bove and S. Eveillard. 2005. Diversity of "*Candidatus* Liberibacter asiaticus," Based on the *omp* gene sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6473-6478.

Chippindall, R.J. and V.H. Whitlock. 1989. Development of an antiserum to detect greening disease of citrus. *Phytopath.* 79 : 1212 (Abstr.).

Druka, A., Burns, T., Zhang, S. and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J. Gen. Virology*. 77: 1975-1983.

Ke, C., Ke, S., Wu, R.J., Yang, H. and P.T. Hsu. 1993. Purification and serology of the organism associated with citrus Huanglongbing. *In* Proc. 12th Conf. Int. Organ. Citrus Virol., pp. 220-223, University of California, Riverside.

Laemmli, E.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T 4. *Nature.* 227: 680-685.

Murray, R.G.E. and K.H. Schleifer. 1994. Taxonomic notera proposal for recording the properties of pulative taxa of prokaryotes. *J. Sys. Bacteriol.* 44: 174-176.

Ohtsu, Y., Prommintara, M., Kawashima, K., Okuda, S., Goto, T., Yamamoto, M., Kiratiya-angul, S., Choopanya, D. and T. Kano. 1995. Development of methods for the diagnosis and control of citrus greening disease in Thailand. Final report under the cooperation research program between Thailand and Japan. 63 p.

Ohtsu, Y., Prommintara, M., Okuda, S., Goto, T., Kano, T. Nakashima, K., Koiszumi, M. Imada, J. and K. Kawashima. 2002. Partial purification of Thai isolate of citrus huanglongbing (greening) bacterium and antiserum production for serological diagnosis. J. Gen. Plant Pathol. 68 : 372-377.

Villechanoux, S., Garnier, M. and J.M. Bove. 1990. Purification of bacterium-like organism associated with greening disease of citrus by immunoaffinity chromatography and monoclonal antibodies. Curr. Microbiol. 21 : 175-180.

AGGCCT GAAGTTGATA AGGGTATGGG CGTAGAAGGG-> (OMP1Stu)

1 GAAGTTGATA AGGGTATGGG CGTAGAAGGG CATATTGAGG ATAATAACCT TTTTGGTCAG

CTTCAACTAT TCCCATACCC GCATCTTCCC GTATAACTCC TATTATTGGA AAAACCAGTC

61 GGGTATAGAG CTCGTTTAGC GGCAGGGGTT GGACGTCATG CAGTACAAAA CTATACTTTT

CCCATATCTC GAGCAAATCG CCGTCCCCAA CCTGCAGTAC GTCATGTTTT GATATGAAAA

ATG GTA GGT CTC Agc gcC TAT TTT TTA GGG AGT CCT ATA TCC GCG→ (OMP7 Strep)

GGATCCTATTT TTTAGGGAGT CCTA→(OMP3N)

121 AGTGTTGAGG ATCCATATTT TTTAGGGAGT CCTATATCCG CGGGTTTTGA TCTCCAAAAA

TCACAACTCC TAGGTATAAA AAATCCCTCA GGATATAGGC GCCCAAAACT AGAGGTTTTT

181 ACCCATCTTG AAGATGGCTC TCTTGACATA AATGATGAAT CTGCTGCTGT ACGTATGATA

TGGGTAGAAC TTCTACCGAG AGAACTGTAT TTACTACTTA GACGACGACA TGCATACTAT

241 GTTCCTATTA CTGAAAGCAT ATCGACAAGT TTTAAGTATG ATCTTAGGTT TTTACAATAT

CAAGGATAAT GACTTTCGTA TAGCTGTTCA AAATTCATAC TAGAATCCAA AAATGTTATA

301 GGTGCTGTAT CAGAAAAAGA AAAGATCCCT TCGATATATA CAACGTTAAT AGAACATGGA

CCACGACATA GTCTTTTTCT TTTCTAGGGA AGCTATATAT GTTGCAATTA TCTTGTACCT

361 AAATTCAGCA GCCATTCAAC TTCCCAAAGT ATCATCTATA ATACACTAGA TAACCCAATT

TTTAAGTCGT CGGTAAGTTG AAGGGTTTCA TAGTAGATAT TATGTGATCT ATTGGGTTAA

421 GTGCCACGTA AAGGCATGTT GATATCATCT TCTTATGATT ATGCAGGTTT TGGAGGAGAT

CACGGTGCAT TTCCGTACAA CTATAGTAGA AGAATACTAA TACGTCCAAA ACCTCCTCTA

GGATCCGAG TCACTCAAGC TTAATA→ (OMP5C)

481 TCTCAATATC ATCGGATTGG ATCTCGAGCA TCGTATTTTT ATCTTCTATC AGATGATTCT

AGAGTTATAG TAGCCTAACC TAGAGCTCGT AGCATAAAAA TAGAAGATAG TCTACTAAGA

541 GATATTGTCG GTTCTTTACG ATTTGGATAT GGATGTGTCA TTCCTAGCAA TAAAAATTTG

CTATAACAGC CAAGAAATGC TAAACCTATA CCTACACAGT AAGGATCGTT ATTTTTAAAC

601 CAATTGTTTG ATCAGTTCTC AGTGAGTTCG AATTATTATC TGAGGGGATT TGCATATAAG

GTTAACAAAC TAGTCAAGAG TCACTCAAGC TTAATAATAG ACTCCCCTAA ACGTATATTC

←GAG TCACTCAAGC TTAATACTCGAG (OMP4N)

661 GGTATAGGTC CGCGTGTGGA TAAGAAATAT GCGATTGGAG GTAAGATTTA TTCGTCTGCA

CCATATCCAG GCGCACACCT ATTCTTTATA CGCTAACCTC CATTCTAAAT AAGCAGACGT

721 AGTGCAGCAG TGAGTTTTCC CATGCCTCTT GTTCCTGAAA GGGCTGGTTT GCGTGGTGCT

TCACGTCGTC ACTCAAAAGG GTACGGAGAA CAAGGACTTT CCCGACCAAA CGCACCACGA

781 TTTTTTGTTG ATTCTGCGAC TCTTTATGCA AATCATGTTG CTCTCGGTGC CGATAAGCTG

AAAAAACAAC TAAGACGCTG AGAAATACGT TTAGTACAAC GAGAGCCACG GCTATTCGAC

841 GAAGGGAATG ATTCTTTCTG GCGTGTTTCT ACTGGAGTAG AAATAATGTG GAATTCTCCA

CTTCCCTTAC TAAGAAAGAC CGCACAAAGA TGACCTCATC TTTATTACAC CTTAAGAGGT

901 CTCGGGATGA TGGGTGTCTA TTATGGTATA CCATTGCGTC ACCGAGAGGG TGATAAAATT

GAGCCCTACT ACCCACAGAT AATACCATAT GGTAACGCAG TGGCTCTCCC ACTATTTTAA

961 CAGCAGTTTG GTTTTCGTAT AGGTAATCGC ATGTAG

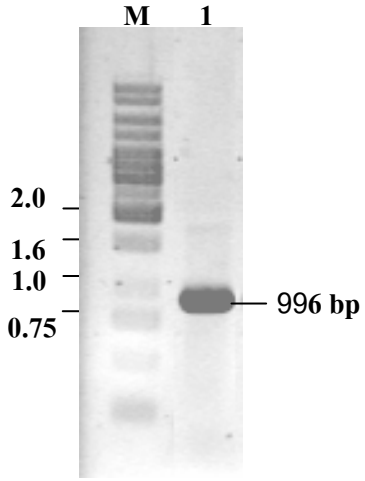
GTCGTCAAAC CAAAAGCATA TCCATTAGCG TTCATC

← AAAC CAAAAGCTTT CCATTAGCGTACATC TCCGGA (OMP2Stu)

←C CAAAAGCATA TCCATTAGCG TACAct atACTC TGGATGGTA (OMP8 Strep)

←GAG TCACTCAAGC TTAATACTCGAG (OMP6C)

ภาพที่ 1. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *omp* ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus สาเหตุโรคกรีนนิ่งส้ม และ ไพร เมอร์ที่ออกแบบบนยีน omp

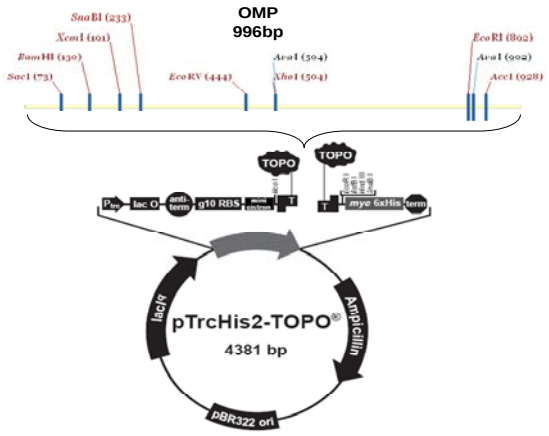


ภาพที่ 2. การเพิ่มปริมาณยีน *omp* โดยใช้ไพรเมอร์ OMP1 Stu และ OMP2 Stu วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

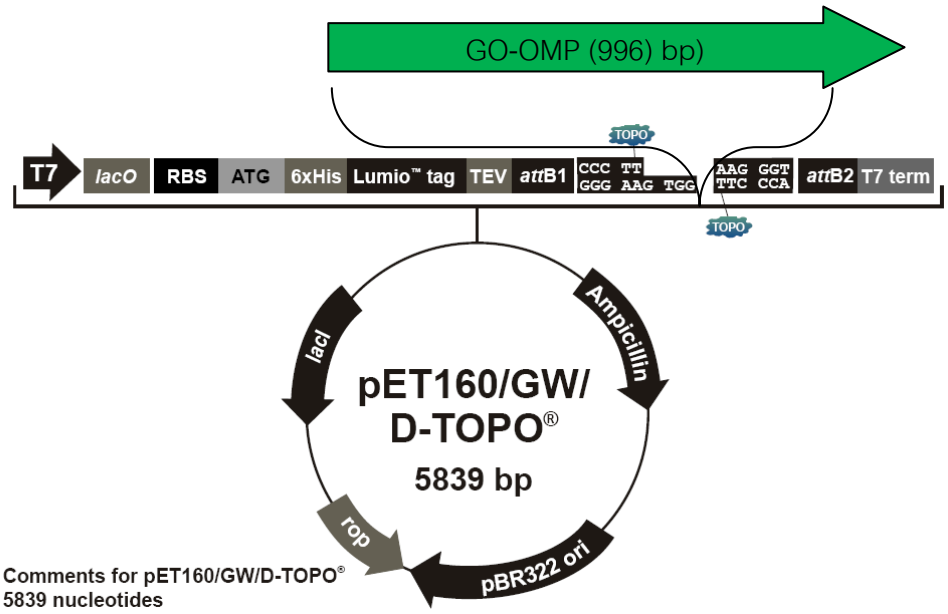
M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

1 = ดีเอ็นเอของยีน *omp* จากแพงพวยที่เป็นโรคกรีนนิ่ง

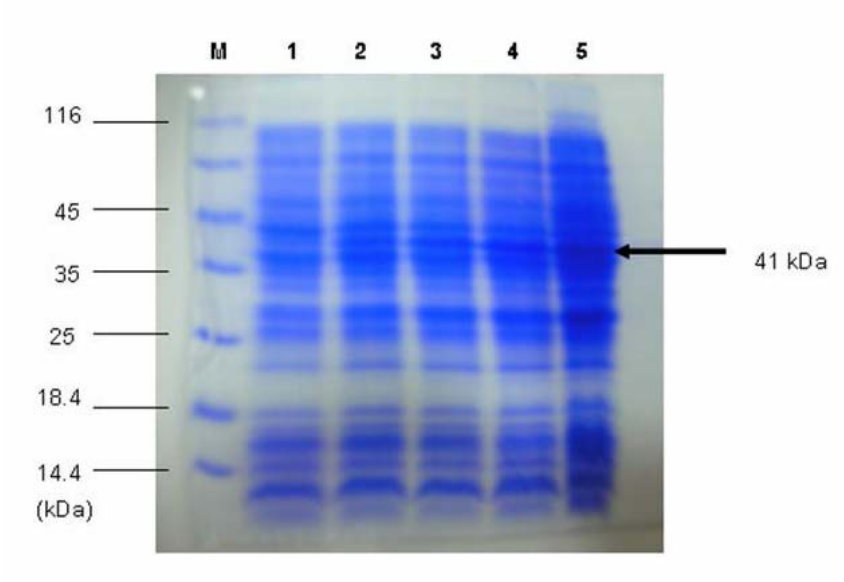
```
      E V D K G M G V E G H I E D N N L F G Q
1     GAAGTTGATAAGGGTATGGGCGTAGAAGGGCATATTGAGGATAATAACCTTTTTGGTCAG
      G Y R A R L A A G V G R H A V Q N Y T F
61    GGGTATAGAGCTCGTTTAGCGGCAGGGGTTGGACGTCATGCAGTACAAAACTATACTTTT
      S V E D P Y F L G S P I S A G F D L Q K
121   AGTGTTGAGGATCCATATTTTTTAGGGAGTCCTATATCCGCGGGTTTTGATCTCCAAAAA
      T H L E D G S L D I N D E S A A V R M I
181   ACCCATCTTGAAGATGGCTCTCTTGACATAAATGATGAATCTGCTGCTGTACGTATGATA
      V P I T E S I S T S F K Y D L R F L Q Y
241   GTTCCTATTACTGAAAGCATATCGACAAGTTTTAAGTATGATCTTAGGTTTTTACAATAT
      G A V S E K E K I P S I Y T T L I E H G
301   GGTGCTGTATCAGAAAAAGAAAAGATCCCTTCGATATATACAACGTTAATAGAACATGGA
      K F S S H S T S Q S I I Y N T L D N P I
361   AAATTCAGCAGCCATTCAACTTCCCAAAGTATCATCTATAATACACTAGATAACCCAATT
      V P R K G M L I S S S Y D Y A G F G G D
421   GTGCCACGTAAAGGCATGTTGATATCATCTTCTTATGATTATGCAGGTTTTGGAGGAGAT
      S Q Y H R I G S R A S Y F Y L L S D D S
481   TCTCAATATCATCGGATTGGATCTCGAGCATCGTATTTTTATCTTCTATCAGATGATTCT
      D I V G S L R F G Y G C V I P S N K N L
541   GATATTGTCGGTTCTTTACGATTTGGATATGGATGTGTCATTCCTAGCAATAAAAATTTG
      Q L F D Q F S V S S N Y Y L R G F A Y K
601   CAATTGTTTGATCAGTTCTCAGTGAGTTCGAATTATTATCTGAGGGGATTTGCATATAAG
      G I G P R V D K K Y A I G G K I Y S S A
661   GGTATAGGTCCGCGTGTGGATAAGAAATATGCGATTGGAGGTAAGATTTATTCGTCTGCA
      S A A V S F P M P L V P E R A G L R G A
721   AGTGCAGCAGTGAGTTTTCCCATGCCTCTTGTTCCTGAAAGGGCTGGTTTGCGTGGTGCT
      F F V D S A T L Y A N H V A L G A D K L
781   TTTTTTGTTGATTCTGCGACTCTTTATGCAAATCATGTTGCTCTCGGTGCCGATAAGCTG
      E G N D S F W R V S T G V E I M W N S P
841   GAAGGGAATGATTCTTTCTGGCGTGTTTCTACTGGAGTAGAAATAATGTGGAATTCTCCA
      L G M M G V Y Y G I P L R H R E G D K I
901   CTCGGGATGATGGGTGTCTATTATGGTATACCATTGCGTCACCGAGAGGGTGATAAAATT
      Q Q F G F R I G N R M *
961   CAGCAGTTTGGTTTTCGTATAGGTAATCGCATGTAG
```



ภาพที่ 3. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *omp* (996 bp) ที่ transform เข้าสู่ พลาสมิด pTrcHis2-TOPO



ภาพที่ 4. subcloning ยีน *OMP* ขนาด 996 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen)

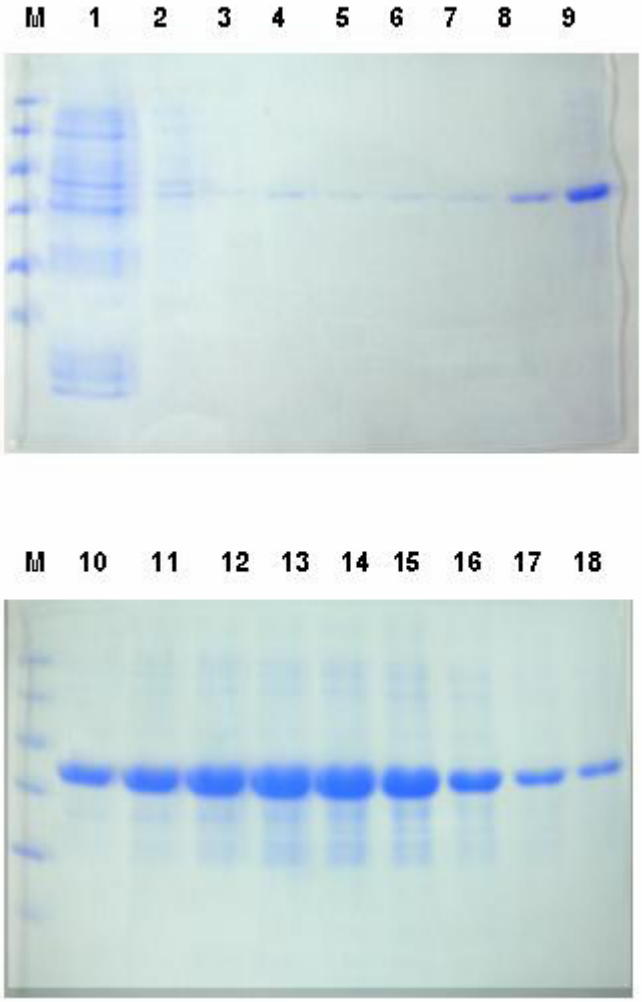


ภาพที่ 5 ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET 160/GW/D-TOPO®-*omp* ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1 : โปรตีนที่แยกได้ก่อนการชักนำด้วย IPTG

2-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังการชักนำ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังจากล้าง column ด้วย washing buffer

6-18 : โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ตั้งแต่ 1-13 หลังการใช้ eluting buffer

การผลิตแอนติซีรัมจากไก่ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptomyces scabies* สาเหตุโรคแผลสะเก็ดของมันฝรั่งและการตรวจหาเชื้อนี้จากหัวพันธุ์นำเข้าและมันฝรั่งที่ผลิตได้ในประเทศ

Chicken antibody production against *Streptomyces scabies* causal agent of potato common scab and its detection from potato import seed and domestic production

วงศ์ บุญสืบสกุล[1] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[1] วิวัฒน์ ภานุอำไพ[2] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์[3]

1 กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2 ศบป.เชียงใหม่ อ.ฝาง จ.เชียงใหม่

3 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างจากผู้นำเข้า 2 ราย สหกรณ์ผู้ปลูกมันฝรั่ง 1 ราย ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ด 23 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งจากแปลงเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ 19 ราย ได้ 32 ตัวอย่าง รวม 55 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียจากอาการแผลสะเก็ดด้วยอาหารกึ่งจำเพาะ NPPC (Nystatin,polymyxin, penicillin, cycloheximide water agar) 44 ไอโซเลท เป็นมันฝรั่งนำเข้า 19 ไอโซเลท มันฝรั่งในประเทศ 25 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคพบว่า 22 ไอโซเลท ทำลายหัวมันฝรั่งเป็น แผลสะเก็ด แยกเชื้อกลับ (reisolation)ได้เชื้อ 19 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดในรูปถาวร กึ่งถาวรและชั่วคราว เพื่อใช้ในการทดลองและศึกษาต่อไป จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการสร้างสปอร์จากเชื้อ 5 ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้งหมดมีปฏิกิริยาเป็นชนิดแกรมบวก โคโลนีสีเทาเกาะกันแน่นคล้ายเส้นใยเชื้อราแต่ขนาดเล็กกว่า สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลในอาหาร ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์เรียงต่อกันเป็นเกลียวอยู่เหนือโคโลนีและสามารถสร้างกรด ใน sucrose glucose lactose mannital inositol xylose cellulose จากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถสรุป ได้ว่าเป็นเชื้อ *S. scabies* ตาม Loria *et al*. (1997) เลือกเชื้อ *S. scabies* ที่พบในมันฝรั่งนำเข้าและที่ผลิตในประเทศอย่างละไอโซเลทมาทำการผลิตแอนติซีรัมที่เฉพาะต่อเชื้อนี้จากไก่ตามขั้นตอนของ Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. พบว่าแอนติเซรัมที่ผลิตได้มีปฏิกิริยาทางเซรุมวิทยาจำเพาะต่อเชื้อ *S. scabies* และสามารถผลิตได้ปริมาณมากพอที่จะได้นำไปพัฒนาเป็นชุดสำเร็จเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดต่อไป

รหัสการทดลอง 09 01 49 02

คำนำ

Brumfield *et al.*1961 พบว่าแอนตีซีรัมจาก ไก่งวง เป็ดและไก่ สามารถจับเฉพาะกับแอนคิเจนที่เป็นตัวกระตุ้นในขบวบผลิตแอนตีซีรัม (primary antigen) เช่นดียวกับ Stolfi *et al.*1971 ที่พบว่าแอนตีซีรัมจากสัตว์ปีกมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส Losch *et al.*1986 รายงานว่าใข่ไก่เป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ที่สามารถผลิตแอนติบอดี้ Montes Peres *et al.*1994 ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพแอนติซีรัมที่ผลิตจากไก่และกระต่ายต่อฮอร์โมนโปรเกสเตโรนไม่พบความแตกต่างทั้งความไว (sensitivity) และความจำเพาะ(specificity) ต่อแอนติเจนปฐมภูมิที่ใช้กระตุ้นสัตว์ทั้งสองชนิด Van Regenmortel and Burckhard1985 รายงานถึงปริมาณสารภูมิคุ้มกัน (immunogent) ที่เหมาะสมในใข่แดงที่เหมาะต่อการตรวจหาเชื้อไวรัส ในขบวนการอีไลซ่า Behn *et al.* 1996 รายงานว่าพบความแตกต่างของสารภูมิคุ้มกันที่มาจากแอนติเจนที่เป็นโปรตีนต่างชนิด Concetti *et al.*1994 พบว่าความแตกต่างของการสร้างสารภูมิคุ้มกันที่แตกต่างตามชนิดของเซลไขกระดูกที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเซลไขกระดูกได้ Rose *et al.*1974 พบวิธีการแยกสารภูมิคุ้มกันชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน Erhard *et al.*1992 พัฒนาระบบวิธีการตรวจจับเฉพาะ (specific enzyme linked immun-sorbent antibody assay systems) ต่อโมโนโคนอลแอนติเจนชนิด G.M. and A ที่ได้จากเซลม้ามของไก่ Hlinak *et al.* 1996 ผลิตแอนตีซีรัมจากไก่ที่มีแนวโน้มสามารถผลิตเป็นวัคซีนสำหรับโรคที่เกิดกับมนุษย์ Montes *et al.*1994 เปรียบเทียบการผลิตสารภูมิคุ้มกันจากกระต่ายและไก่ที่กระตุ้นด้วยแอนติเจนฮอร์โมนสารภูมิคุ้มกัน(progesterone hormone) พบว่ามีความแตกต่างกันน้อยมาก Marquart and Newman 1970 พบว่าแอนติซีรัมจากไก่สามารถมีความจำเพาะและสามารถตรวจหาเชื้อมายโคพลาสม่าสาเหตุโรคแคะแกรนของข้าวโพดและวัชพืชที่เป็นพืชอาศัยได้ Peralta *et al*. 1994. รายงานว่าแอนติซีรัมจากใข่แดงไก่ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคคน *Salmonella enderitidis* และเชื้อโรคอหิวาตกโรค (clolera) มีความจำเพาะต่อกันสูง Akita *et al.*1993 เปรียบเทียบวิธีการคัดแยกสารภูมิคุ้มกันบริสุทธิ์ที่ได้จากการกระตุ้นจากแบคทีเรีย Ecoli พบว่าหลังจากคัดแยกโดยวิธีตกตระกอนในสารแอมโมเนียมซัลเฟรตกับน้ำตาลเข้มข้นมีความแตกต่างกันน้อยมาก

Streptomyces scabies สาเหตุโรคสะเก็ดแผล (common scab) ของมันฝรั่งและพืชหัวอื่น ๆ หลายชนิด ๆ เข้าทำลายหัวมันฝรั่งเกิดอาการสะเก็ดแผลนูนยกสูงจากผิวลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม เป็นแผลเดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม แผลกินลึกถึงเนื้อในทำให้หัวมันฝรั่งเสียหาย ราคาตกหรืออาจขายไม่ได้ เชื้อสาเหตุโรคเป็นแบคทีเรียแกรมบวก อาศัยอยู่ในดิน(soil inhabitant) สร้างสปอร์เพื่อการแพร่กระจายเชื้อ สปอร์สีเทา ผิวเรียบเกาะเรียงเดี่ยวเป็นสายเกลียว (spiral chain) สามารถดำรงชีวิตในเศษซากพืชอาศัย แพร่กระจายไปกับน้ำหรือดินที่มีการเคลื่นย้ายรวมทั้งละอองดินที่ถูกพัดพาโดยพายุ การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีมีลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีขาว ผิวย่น

ขนาด 3-10 มม หรือมากกว่าขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้เลี้ยงและอายุของเชื้อ (Loria et al. 1997) Manabe et al. 2006 รายงานพบอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะที่ใช้สำหรับแยกเชื้อนี้จากดิน แผลที่รากหัวมันฝรั่ง และซากพืช ปัจจุบันพบว่าเชื้อนี้แพร่กระจายไปทั่วโลก (Lambert and Loria, 1989) สำหรับประเทศไทยพบโรคนี้ติดมากับหัวมันฝรั่งนำเข้า แต่ไม่มีรายงานว่าพบโรคหรือเชื้อ *S. scabies* ในประเทศไทย

การทดลองนี้จะแยกเชื้อ *Streptomyces scabies* จากหัวมันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ

ด้วยอาหารเฉพาะตามที่มีรายงานมาก่อน จากนั้นนำเชื้อมาจำแนกชนิดโดยทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาเปรียบเทียบกับเชื้อ *Streptomyces scabies* ที่รักษาไว้ในสาระบบการเก็บรักษาเชื้อของ กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช หลังจากจำแนกเชื้อเสร็จแล้วว่าเป็น *S. scabies* นำเชื้อมาเตรียมเป็นแอนติเจนฉีดเข้าใต้ผิวหนังของไก่พันธุ์ไข่ ตามขั้นตอนของ Shimizu *et al.* 1988, 1994 เก็บเกี่ยวและทดสอบคุณสมบัติของสารภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *S. scabies* นำมาตรวจหาเชื้อนี้จากมันฝรั่งนำเข้าและที่ผลิตได้ในประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลทางกักกันพืชของเชื้อนี้สำหรับประเทศไทย ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางโรคพืชวิทยาและจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้าและที่ผลิตได้ในประเทศเลือกหัวที่มีอาการสะเก็ดแผล
2. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการแยกเชื้อ แยกเชื้อสาเหตุโรค
3. ทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคและจำแนกชนิดเชื้อและที่เก็บรักษาเชื้อที่กลุ่มงานบักเตรีวิทยา
4. ผลิตแอนติเซรัมจากไก่ด้วยแอนติเจนเชื้อ *S. scabies* (เลี้ยงไก่, เตรียมเชื้อบริสุทธิ์, dระตุ้นการผลิตโดยฉีดเชื้อเข้าไก่, ทดสอบค่าไตเตอร์จากไข่ไก่, แยกสารภูมิคุ้มกัน IgYบริสุทธิ์, ทดสอบความจำเพาะโดยวิธี Indirect ELISA)
5. พัฒนาเป็นชุดสำเร็จตรวจหาเชื้อ *S. scabies*

6.สำรวจและตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคสะเก็ดแผลที่พบในมันฝรั่งที่ผลิตในประเทศและนำเข้าด้วยชุดสำเร็จที่ผลิตได้ เขียนรายงาน สรุปวิเคราะห์ผลการวิจัย เผยแพร่

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ได้ข้อมูลเกี่ยวกับงานวิจัยที่ดำเนินการในต่างประเทศที่ผ่านมา

2. ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ดและตัวอย่างหัวมันฝรั่งที่แสดงแผล สะเก็ดจากเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ จำนวน 47 ตัวอย่าง

3. ตรวจเอกสารงานวิจัยทั้งโครงการ เตรียมอุปกรณ์เครื่องมือและบุคลากรไปเก็บตัวอย่างจากโรงเก็บหัวพันธุ์มันฝรั่งภาคเอกชนผู้นำเข้าและเกษตรกรผู้ผลิตมันฝรั่ง ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจากต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ดและจากเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ 44 ตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรียที่แยกจากอาการแผลสะเก็ดด้วยอาหารกึ่งจำเพาะในห้องปฏิบัติการ ได้เชื้อ 42 ไอโซเลท ทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคจากเชื้อที่แยกได้พบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดอาการโรคแผลสะเก็ด 19 ไอโซเลท

4.สำรวจและเก็บตัวอย่างจากผู้นำเข้า 2 ราย สหกรณ์ผู้ปลูกมันฝรั่ง 1 ราย ได้ตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าจาก ต่างประเทศที่แสดงอาการโรคแผลสะเก็ด 23 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งจากแปลงเกษตรกรที่ปลูกมันฝรั่งในประเทศ 19 ราย ได้ 32 ตัวอย่าง รวม 55 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียจากอาการแผลสะเก็ดด้วยอาหารกึ่งจำเพาะNPPC 44ไอโซเลท เป็นมันฝรั่งนำเข้า 19 ไอโซเลท มันฝรั่งในประเทศ 25 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการเป็นเชื้อสาเหตุโรคพบว่า 22 ไอโซเลท ทำลายหัวมันฝรั่งเป็น แผลสะเก็ด แยกเชื้อกลับ (reisolation)ได้เชื้อ 19 ไอโซเลท เก็บรักษาเชื้อที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดในรูปถาวร กึ่งถาวรและชั่วคราว เพื่อใช้ในการทดลองอื่น ๆ ต่อไป

5.จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการสร้างสปอร์จากเชื้อ 5ไอโซเลท พบว่าเชื้อทั้งหมดมีปฏิกิริยาเป็นชนิดแกรมบวก โคโลนีสีเทาเกาะกันแน่นคล้ายเส้นใยเชื้อราแต่ขนายเล็กกว่า สร้างเม็ดสีสีน้ำตาลในอาหาร ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์เรียงต่อกันเป็นเกลียวอยู่เหนือโคโลนีและสามารถสร้างกรด ใน sucrose glucose lactose mannital inositol xylose cellulose จากคุณสมบัติดังกล่าวสามารถสรุปตาม Loria *et al*. (1997) ได้ว่าเป็นเชื้อ *S. scabies*

6.นำเชื้อ*S. scabies* ที่แยกได้จากการทดลองนี้มาทำการผลิตแอนติซีรัมที่เฉพาะต่อเชื้อนี้จากไก่ตามขั้นตอนของ Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. พบว่าแอนติเซรัมที่ผลิตได้มีปฏิกิริยาทางเซรุมวิทยาจำเพาะต่อเชื้อ *S. scabies* และสามารถผลิตได้ปริมาณมากพอที่จะได้นำไปพัฒนาเป็นชุดสำเร็จเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคแผลสะเก็ดต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

(อยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง)

--

เอกสารอ้างอิง

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วนิดา ฐิตะฐานและสุเนตรา ภาวิจิตร 2540. การผลิตแอนติเซรัมที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 254 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 17 หน้า.

วงศ์ บุญสืบสกุล, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์และวนิดา ฐิตะฐาน 2543. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Ralstonia solanacearum* ในขบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2543 กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กทม. 15 หน้า.

Akita, E.M. and Nakai, S. 1993. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with enteroxigenic E. coli strain. J. Immunology. 160:207-214.

Behn, I., Hommel, U., Oertel, Hauschildt, S. 1996. Kinetics of IgY formation after immunisation of Hens with different protein antigen. Altex 13 Supplement 96:18-21.

Brumfield H.P., Benson, H. and Pomeroy, B.S. 1961. Procedure for Modified complement fixation test with Turkey, Duck and Chicken serums antibody. Avian Dis. 5:270-282

Concetti, A, Ripani, E. Barboni, L., Torregiani, E., Gariboldi, P. and Venanz, F.M. 1994.Immunorecognition of ring skeleton of taxanes by chicken yolk antibodies. Bilogical Chemistry 375(6):419-423

Erhard, M.H., Quistorp, I.V., Schranner, I. , Jungling, A., Kaspers, B.,Schmid, P. And Kuhlmann, R. 1992. Development of specificenzyme linked immun-sorbent antibody assay systems for the detection of chicken immuno-globulin G.M. and A.using monoclonal antibodies. Poultry Sci.71:302-310

Hlinak, A., Schrodl, W., Witt, S.and Schade, R. 1996. Production of Egg York antibodies against Human cell associated antigens. Altex 13 Supplement 96:76-79.

Kowalczyk, K., Daiss, J., Halpen, J. and Roth, T.F. 1985. Quantification of materal-fetal IgG transport in the chicken. J. Immunology 54:755-762

Losch, U., Schranner, I., Wanke, R. and Jurgens, L. 1986. The chicken egg, an antibody source. J. Vet Medicine.98:609-619

Marquart, W.W. and Newman, J.A. 1970. A direct complement-fixation test for detection of mycoplasma antibodies in chicken serum. Avian Dis. 15:139-149

Peralta, R.C., Yokoyama, H., Ikemori, Y., Kuroki, M. and Kodama, Y. 1994. Passive immunization against *Salmonella enderitidis* with specificity by hen egg-yolk antibodies. J. Med. Microbiology. 41(1):29-35

Montes Peres, R.C., Murcia Meija, C. and Zarco Quintero, L. 1994. Production of antibodies against progesterone hormone from the egg yolk of hens and from rabbit blood serum to be used comparing. Veterinaria-Mexico 25 (2):117-125

Rose, M.E., Orlan, E. and Butterss, N. 1974 Immunoglobulin classes in the hens egg on its segregation in yolk and white. Europe J. Immunology 4:521-523

Schade, R., Henklein, P., Hlinak, A., de Vente, J. And Steinbusch, H. 1996. Specificity of Chicken (IgY) versus rabbit (IgG) antibodies raised against cholecystokin octopeptide. Altex 13 Supplement 96;80-85

Shimizu, M., Fitzsimmons, R.C. and Nakai, S.1988. Anti-Ecoli immunoglobulin-Y isolated from egg yolk of immunized chicken as a potential as a potential food ingredient. J. Food Sci. 53;1360-1366.

Shimizu, M., Nagashima, H., Hashimoto, K. and Suzuki, T. 1994. Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations. J. Food Sci. 59(4):763

Stolfi, R.L., Fugmann, R.A., Jensen, J.J. and Sigel, M.M. 1971. A C1 fixation method for the measurement of chicken anti-viral antibody. Immunology 20:299-306

Van Regenmortel and Burckhard, J. 1985.Quantitative microcomplement fixation test using chicken anti-viral antibody extracted from egg yolk. J.Virol. Meth. 11:217-223.

การผลิตแอนติซีรัมของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย

Antiserum production of *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-2 causing pineapple wilt disease by bacterial cell system

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ศรีเมฆ ชาวโพงพาง เยาวภา ตันติวานิช
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

นำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่Lumi_PMWaV2F (5' CACCGCTCA GAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3') และ Lumi_PMWaV2R (5' CCCTGAAACAGCTCCCTG GTTCAGCT 3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 909 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pCR®8/GW/TOPO® , Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Miniprep และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 909 คู่เบส หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 เข้าสู่ protein expression vector (pET160/GW/D-TOPO® , Invitrogen) ซึ่งมีขนาด 5.8 กิโลเบส และ transform เข้า *E. coli* Top 10 ตรวจพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส คัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร- และที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งพบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า พบ band ขนาด 38 กิโลดาลตันในทุก fraction และ พบว่า โปรตีนสามารถผ่าน column Ni-NTP ได้น้อยมาก ขณะนี้กำลังทำการปรับ pH ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA เพื่อไม่ให้โปรตีนถูกชะล้างไปในขั้นตอนของการล้าง column

---

รหัสการทดลอง 09 01 49 02 03 04 10 51

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple) พบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทยและคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2546; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547) นอกจากนี้เริ่มพบการเข้าทำลายของโรคนี้ในเขตจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญเพื่อส่งโรงงานแปรรูปของภาคตะวันออก พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยวคือพันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด เพราะนอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, 2546)

โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35 x 10^6 ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์ คลอสเตอโรวิริดี (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ

ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al*., 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al*, 1992)

วิธีการที่สามารถใช้จำแนกไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 คือ วิธีอิมมูโนวิทยา (Immunology) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 (Sether & Hu, 2002) และวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสแต่ละชนิด (Beardsley, 1993; Hu *et al*., 1996) ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องอาศัยความชำนาญเฉพาะด้านรวมทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดเป็นจำนวนมาก และในฮาวายมีรายงานว่า สับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยว เมื่อได้รับเชื้อไวรัส PMWaV-2 และไม่แสดงอาการของโรคถ้าได้รับเชื้อ PMWaV-1 เพียงชนิดเดียว แต่ถ้าได้รับเชื้อทั้งสองชนิดสับปะรดจะแสดงอาการเหี่ยวอย่างรุนแรง ฉะนั้นควรมีการผลิตแอนติซีรัมของ PMWaV-2 เพื่อใช้ในการคัดเลือกหน่อพันธุ์ปลอดโรคเพื่อนำไปปลูกในปริมาณมาก เพราะเป็นวิธีที่ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถตรวจตัวอย่างได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก แต่เนื่องจากปริมาณของคลอสเตอโรไวรัสในพืชมีน้อย ทำให้ประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ยังไม่ดีที่สุด ในปัจจุบันอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพทำให้สามารถผลิตโปรตีนต่างๆในเซลล์แบคทีเรียในปริมาณมากได้ และมีความบริสุทธิ์สูง จึงเป็นการเพิ่มปริมาณแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลองต่อไป

Druka และคณะ (1996) รายงานการผลิตแอนติซีรัมจากชิ้นของ coat protein ยีน จากสายพันธุ์ข้าวของประเทศฟิลิปปินส์ โดยนำมาโคลนเข้า vector แล้วนำไปเชื่อมกับ MBP fusion proteinsจากนั้นนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างแอนติบอดี แอนติซีรัมที่ผลิตได้สามารถตรวจวินิจฉัยไวรัสใบสีส้มรูปทรงกลมได้โดยวิธี ELISA, Western blotting และ IEM ต่อมา Cerovska และคณะ (2003) ได้ทำการผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีจากยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส (ยีน CP) ของเชื้อ *Potato mop-top virus* (PMTV) โดยโคลนชิ้นของยีน CP เข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้ตรวจหาไวรัส PMTVได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA หรือ Osmar และคณะ (2004) ได้นำยีน CP ของเชื้อ *Apple stem grooving virus* (ASGV) มาเพิ่มปริมาณโดยเทคนิค RT-PCR นำไปโคลนใน vector ตรวจหาลำดับเบส และ โคลนเข้าสู่ expression vector แล้วเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* จากนั้นนำมาแยกให้บริสุทธิ์และฉีดเข้าสัตว์ทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัม จากการทดสอบพบว่าแอนติซีรัมที่ได้สามารถใช้

ตรวจหาไวรัส ASGV ได้ผลดีโดยใช้เทคนิค ELISA นอกจากนี้ ลำพึง และคณะ (2547) ได้ทำการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนออกจากเซลล์แบคทีเรีย และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตแอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรค ฉะนั้นควรพัฒนาวิธีการผลิตแอนติซีรัมของ PMWaV-2 โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ การโคลนยีน และนำมาเพิ่มปริมาณโปรตีนของเชื้อในเซลล์แบคทีเรีย ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่าย เพื่อให้ได้แอนติซีรัมที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับใช้ในการคัดเลือกหน่อพันธุ์ปลอดโรคเพื่อนำไปปลูกในปริมาณมาก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-2
2. ไพรเมอร์
3. พลาสมิดพาหะ (cloning และ expression vectors)
4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนของการโคลนยีน
5. กระต่าย อุปกรณ์และสารเคมีในการผลิตแอนติซีรัม
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อ โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยา

วิธีการ

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

1.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 1 คู่ จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค(cp gene) ของเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยวสับปะรด ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับ PMWaV-2 ได้แก่

Lumi_PMWaV2F 5' CACCGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3'

Lumi_PMWaV2R 5' CCCTGAAACAGCTCCCTGGTTCAGCT 3'

เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ ในกระบวนการ cloning เข้าสู่ vector

1.2 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อ

โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบสับปะรดที่มีอาการของโรค ประมาณ 0.1 กรัม บดในโกร่งที่เย็นโดยการเติมไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ใช้ช้อนสเตนเลสที่ผ่านเผาด้วยเปลวไฟ ตักผงละเอียดที่บดไว้ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม buffer RLT ที่เติม beta mercaptoethanol (10 ไมโครลิตร/1 มิลลิลิตร RLT) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยและนำหลอดไปแช่ที่ 56 ºซ นาน 1-3 นาที จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAshredder spin column (สีม่วง) นำ column ซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที น้ำไสจะผ่าน column ลงในหลอดที่รองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ส่วนเศษชิ้นส่วนพืชติดอยู่ด้านบนcolumn

3. เติม absolute ethanol ในหลอดที่รองรับน้ำใส ปริมาตร 0.5 เท่า (225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นลง

4. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน RNeasy mini column (สีชมพู) และวางซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 12,00 รอบ/นาที นาน 15 วินาที

5. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วเติมสารละลาย RW1 ลงใน column ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,00 รอบ/นาที 15 วินาที

6. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วล้าง column ด้วย RPE 500 ไมโครลิตร โดยการหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที 15 วินาที

7. ย้าย column ซ้อนบนหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ (RNase-free water) 50 ไมโครลิตร ใน column เพื่อชะล้าง RNAจาก column รอประมาณ 1 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที อาร์เอ็นเอ ที่ได้ละลายในน้ำผ่าน column และถูกเก็บไว้ในหลอดรองรับ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80 ºซ

1.3 การเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR และการโคลนยีน

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) เพิ่มปริมาณของชิ้น cDNA โดยใช้ไพรเมอร์

Lumi_PMWaV2F 5' CACCGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3'

Lumi_PMWaV2R 5' CCCTGAAACAGCTCCCTGGTTCAGCT 3'

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

RNase free water	15.0	ไมโครลิตร
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5.0	ไมโครลิตร
dNTPs (10 mM)	1.0	ไมโครลิตร

Lumi_PMWaV2F (20 uM)	0.5	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2R (20 uM)	0.5	ไมโครลิตร
QIAGEN OneStep RT-PCR enz. Mix	1.0	ไมโครลิตร
RNA template	2.0	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

50 º ซ 30 นาที

94º ซ 15 นาที (activated hot start *Taq* DNA pol, deactivated reverse)

Denature 94º ซ	45	วินาที	30 รอบ
Annealing 58 º ซ	45	วินาที	
Extension 72 º ซ	45	วินาที	
Final extension 72º ซ	5	นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.4 การต่อเชื่อม (ligation) PCR product เข้าสู่ พลาสมิดพาหะ (plasmid vector)

นำ PCR product 2 ไมโครลิตร ผสมกับ โคลนนิ่งเวคเตอร์ pCR®8/GW/TOPO® (Invitrogen) 1 ไมโครลิตร และ salt solution 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว / ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นดูดมา 3 ไมโครลิตรใส่ในหลอดของ One Shot® cell แช่ในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock cell โดยการแช่หลอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42°C นาน 30 วินาที ก่อนย้ายไปแช่บนน้ำแข็งทันที เติมอาหาร SOC ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ก่อนนำไปเขย่าที่ 37°C นาน 30 นาที ดูดมา 50 ไมโครลิตร และเทแผ่ลงบนอาหารแข็ง 2XYT Agar (ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร) บ่มที่ 37 °C ข้ามคืน

1.5 การสกัดโคลนของพลาสมิด และการเพิ่มจำนวนยีนโดยเทคนิค PCR

คัดเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง 2XYT โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ปราศจากเชื้อแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT (มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่) เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37°ซ ข้ามคืน นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว 1 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยง

ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน Solution I (25 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM glucose และ 10 mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม Solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 ไมโครลิตร เขย่าหลอดก่อนที่จะเติม Solution III (3 M potassium acetate pH 5.2) 150 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) 150 ไมโครลิตร เขย่าและแช่บนน้ำแข็ง 10 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนของน้ำใสมาเติมด้วย หนึ่งเท่าโดยปริมาตรของ isopropanol และนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% ethanol และหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม แล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำ (มี RNase 2 % ผสมอยู่) 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่ 37 °ซ นาน 30 นาที

นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R และใช้ Deep Vent DNA Polymerase (Proof reading) แทน *Taq* Polymerase เพื่อให้ได้ PCR Product ที่เป็น blunt ends โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

dNTPs (10 mM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2F (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Lumi_PMWaV2R (20 uM)	1.0	ไมโครลิตร
Deep Vent DNA Polymerase	1.0	ไมโครลิตร
Buffer	1.0	ไมโครลิตร
template	1.0	ไมโครลิตร
dH_2O	19.0	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ DNA ตาม **program** ดังนี้

94° ซ	5	นาที	
Denature 94° ซ	1	นาที	30 รอบ
Annealing 58 ° ซ	1	นาที	
Extension 72 ° ซ	1	นาที	
Final extension 72° ซ	5	นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

1.6 การ subclone เข้าสู่ protein expression vector

นำ PCR product ที่ได้จากข้อ1.5 นำมาเชื่อมต่อ (ligation) เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) และถ่ายเข้าสู่ (transformation)เข้า *E. coli* Top 10 โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2XYT ที่มี ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ผสมอยู่ (ขั้นตอนเหมือนข้อ 1.5) ตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง จากนั้น transform เข้า competent cell ของ *E. coli* BL21 (DES 3) โดยใช้ $CaCl_2$ ที่ 42°C นาน 90 วินาที และแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 3 นาที คัดเลือกโคโลนีของพลาสมิดบนอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นตอนต่อไป

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *cp* ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 % ของอาหาร เขย่าต่ออีก 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker และเก็บตัวอย่างเซลล์หลังการเติม IPTG ที่ 2 4 6 และ 24 ชั่วโมง ครั้งละ 1 มิลลิลิตร นำมาปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่ -20 °ซ จากนั้นแล้วเติม 2xSDS-PAGE sample buffer (0.125 Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.02% bromophenol blue R250, 5% β-Mercaptoethanol) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

นำแบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DES 3) ที่มีพลาสมิดสายผสม pET160/GW/D-TOPO® - *cp* หลังจากลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ที่เวลาอันเหมาะสมในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

มาปั่นตกตะกอนที่ 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที (4°ซ) นำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20 °ซ ข้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B : 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 10 mM Tris-HCl (MW.=121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายหนืดและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที (4 °ซ) เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้ว ด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ใด โดยเทคนิค SDS-PAGE และคำนวนปริมาณโปรตีนที่ผ่าน column โดยใช้สูตรของ Bradford's

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2551 - กันยายน 2553
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP)

ปริมาณอาร์เอ็นเอของใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัส PMWaV-2 ที่ได้จากการสกัด และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R จากการตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วย agarose gel electrophoresis พบ แถบดีเอ็นเอขนาด 909 คู่เบส (bp) (ภาพที่ 1)

การตรวจสอบโคลนต่างๆของพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® หลังต่อเชื่อมกับ PCR product (909 คู่เบส) โดยการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส ด้วยเครื่อง Sequencer พบว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 (ภาพที่ 2)

หลังจาก subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen) ซึ่งเป็น protein expression vector

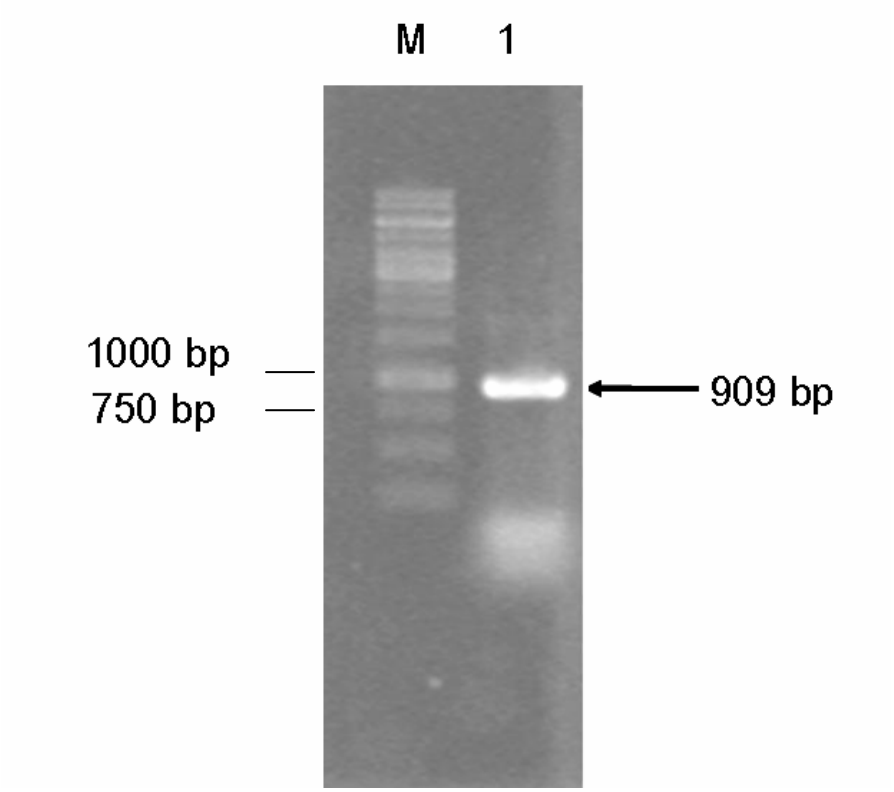
(ขนาด 5.8 กิโลเบส) (ภาพที่ 3) และ transform เข้า *E. coli* Top 10 พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส (ภาพที่ 4) ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร- และที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน

2. การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ recombinant proteinในเซลล์แบคทีเรีย

หลังจากการเติมสาร IPTG เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน จากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจหาระยะเวลาที่เริ่มมีการสังเคราะห์โปรตีนตั้งแต่ 4 ชั่วโมง และพบมากที่สุดเมื่อปล่อยให้เกิดการชักนำข้ามคืน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบ band ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5)

3. การแยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 38 กิโลดาลตันทุก fraction และ พบว่า โปรตีนสามารถผ่าน column Ni-NTP ได้น้อยมาก จึงได้นำโคลนมา purify และส่งไปตรวจสอบลำดับเบสอีกครั้งหนึ่ง ผลการตรวจสอบลำดับเบสของโคลนที่สังเคราะห์โปรตีนได้ พบว่าลำดับเบสถูกต้อง ขณะนี้กำลังทำการปรับ pH ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA เพื่อไม่ให้โปรตีนถูกชะล้างไปในขั้นตอนของการล้าง column



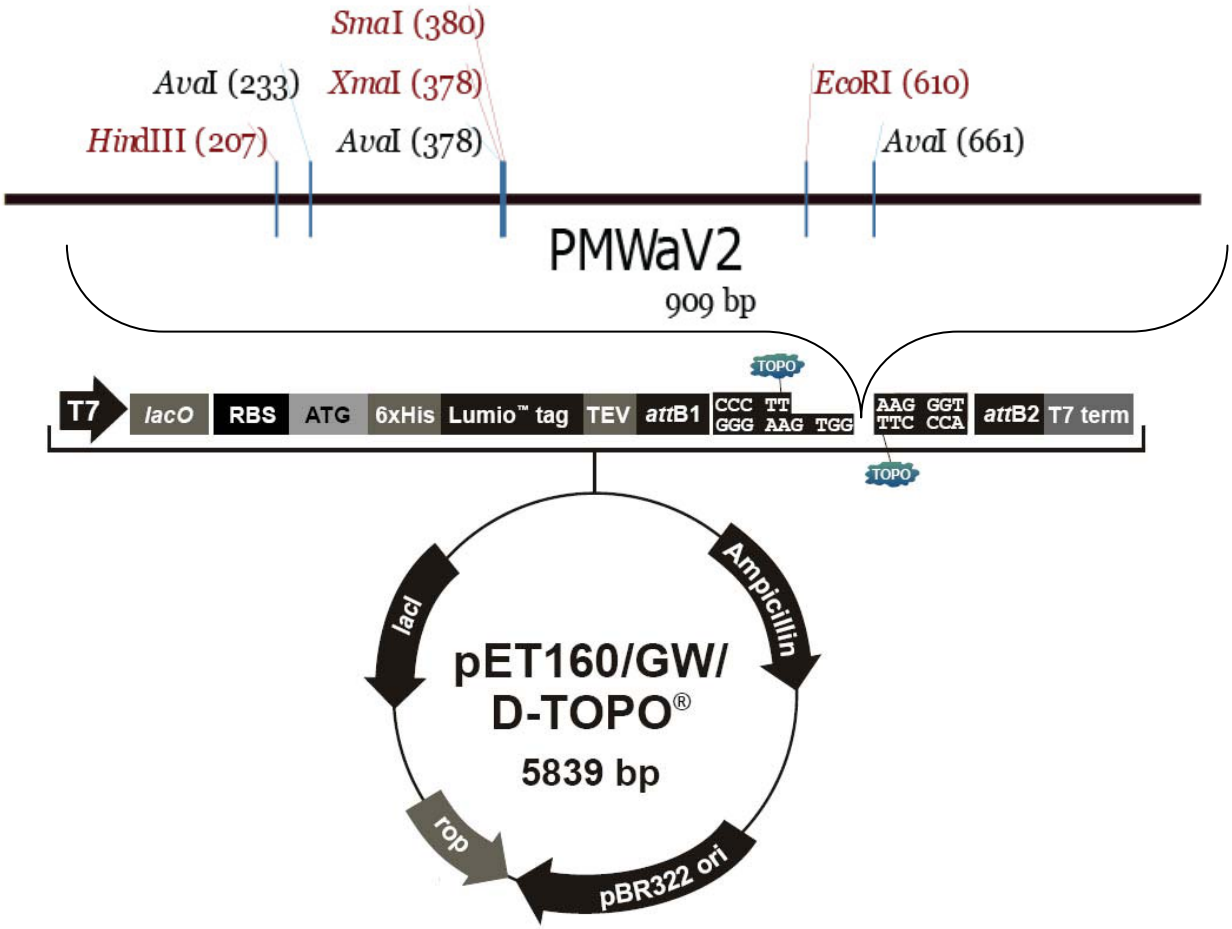
ภาพที่ 1. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส โดยใช้ไพรเมอร์ Lumi_PMWaV2F และ Lumi_PMWaV2R วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis

M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 kb Ladder, Fermentas)

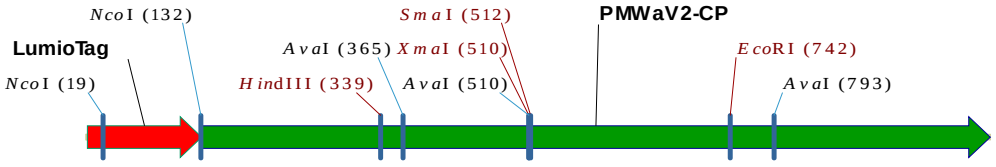
1 = ดีเอ็นเอของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส จากสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว

ภาพที่ 2. ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (909 bp) ที่เชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิด pCR®8/GW/TOPO®

```
     M  A  Q  N     Y  V  A     V  V  E     G  T  I  L     E  S  L     T  A  P
   1 ATGGCTCAGA ATTACGTAGC CGTAGTAGAA GGCACTATTC TCGAAAGTTT GACGGCTCCA
     TACCGAGTCT TAATGCATCG GCATCATCTT CCGTGATAAG AGCTTTCAAA CTGCCGAGGT
      P  K  R  F     R  V  A     T  S  D     V  G  K  Y     Y  D  S     S  K  Y
  61 CCTAAACGAT TTAGAGTGGC GACGTCTGAT GTGGGGAAAT ATTACGATAG TAGCAAATAC
     GGATTTGCTA AATCTCACCG CTGCAGACTA CACCCCTTTA TAATGCTATC ATCGTTTATG
      R  S  V  T     G  V  A     T  A  E     R  D  R  L     P  A  I     E  E  T
 121 CGCTCTGTAA CGGGCGTAGC TACAGCCGAG AGGGATCGGT TACCAGCGAT AGAGGAAACT
     GCGAGACATT GCCCGCATCG ATGTCGGCTC TCCCTAGCCA ATGGTCGCTA TCTCCTTTGA
      E  L  L  A     T  I  P     T  E  A     S  T  D  K     G  V  I     P  E  T
 181 GAACTATTGG CAACAATCCC AACGGAAGCT TCAACAGATA AGGGTGTTAT TCCCGAGACT
     CTTGATAACC GTTGTTAGGG TTGCCTTCGA AGTTGTCTAT TCCCACAATA AGGGCTCTGA
      V  K  R  S     S  N  K     P  E  I     V  D  D  V     S  T  L     L  L  N
 241 GTTAAGAGGT CGAGTAATAA ACCAGAAATA GTAGATGATG TATCAACGTT GCTGTTAAAT
     CAATTCTCCA GCTCATTATT TGGTCTTTAT CATCTACTAC ATAGTTGCAA CGACAATTTA
      P  R  K  N     V  V  L     N  I  G     S  V  K  T     V  P  K     V  V  N
 301 CCTAGAAAGA ACGTTGTACT AAATATTGGA TCGGTTAAAA CCGTGCCAAA GGTAGTTAAT
     GGATCTTTCT TGCAACATGA TTTATAACCT AGCCAATTTT GGCACGGTTT CCATCAATTA
      Q  P  G  L     I  S  R     E  I  A     I  R  I  G     E  A  L     K  E  H
 361 CAGCCGGGTT TGATATCCCG GGAGATTGCT ATCCGTATAG GAGAGGCTCT GAAGGAACAT
     GTCGGCCCAA ACTATAGGGC CCTCTAACGA TAGGCATATC CTCTCCGAGA CTTCCTTGTA
      C  K  Q  V     M  G  S     D  S  S     T  D  L  A     T  Y  F     I  H  L
 421 TGCAAACAAG TTATGGGTTC GGATAGTAGT ACGGACTTAG CTACATACTT TATACATTTG
     ACGTTTGTTC AATACCCAAG CCTATCATCA TGCCTGAATC GATGTATGAA ATATGTAAAC
      I  Q  L  A     I  T  F     S  T  S     K  N  S  E     Y  K  E     F  D  Y
 481 ATTCAACTCG CTATTACGTT CTCTACATCC AAAAATAGCG AATACAAAGA GTTTGACTAT
     TAAGTTGAGC GATAATGCAA GAGATGTAGG TTTTTATCGC TTATGTTTCT CAAACTGATA
      I  E  T  E     T  Q  K     K  I  Y     I  K  D  V     S  E  V     V  E  R
 541 ATAGAAACAG AGACGCAAAA GAAAATATAC ATCAAGGACG TGAGTGAGGT GGTTGAGAGA
     TATCTTTGTC TCTGCGTTTT CTTTTATATG TAGTTCCTGC ACTCACTCCA CCAACTCTCT
      A  A  M  N     S  G  Y     E  N  P     F  R  Q  Y     M  R  Y     F  T  S
 601 GCGGCGATGA ATTCGGGGTA CGAAAACCCG TTTAGGCAAT ATATGCGTTA TTTTACAAGC
     CGCCGCTACT TAAGCCCCAT GCTTTTGGGC AAATCCGTTA TATACGCAAT AAAATGTTCG
      S  S  I  T     L  T  L     N  G  K     I  T  P  N     E  R  T     M  A  H
 661 TCGAGTATAA CACTAACTTT AAATGGTAAA ATAACACCTA ACGAGAGAAC TATGGCTCAT
     AGCTCATATT GTGATTGAAA TTTACCATTT TATTGTGGAT TGCTCTCTTG ATACCGAGTA
      H  G  V  P     K  Q  F     F  A  Y     T  Y  D  F     I  D  P     D  Y  S
 721 CACGGAGTAC CCAAGCAGTT CTTTGCATAT ACTTACGATT TTATTGACCC CGACTATAGC
     GTGCCTCATG GGTTCGTCAA GAAACGTATA TGAATGCTAA AATAACTGGG GCTGATATCG
      L  M  N  H     S  A  I     N  A  Y     N  L  T  R     I  Q  A     F  K  N
 781 CTCATGAATC ATTCGGCGAT TAATGCTTAC AACTTAACGA GGATTCAAGC ATTTAAGAAT
     GAGTACTTAG TAAGCCGCTA ATTACGAATG TTGAATTGCT CCTAAGTTCG TAAATTCTTA
      K  I  A  S     V  N  N     T  M  H     N  T  Y  Q     L  N  Q     G  A  V
 841 AAGATAGCTT CAGTGAACAA TACTATGCAT AACACATACC AGCTGAACCA GGGAGCTGTT
     TTCTATCGAA GTCACTTGTT ATGATACGTA TTGTGTATGG TCGACTTGGT CCCTCGACAA
      S  G  *
 901 TCAGGGTAG
     AGTCCCATC
```



ภาพที่ 3. subcloning ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ขนาด 909 คู่เบส เข้าสู่ expression vector pET160/GW/D-TOPO® (Invitrogen)

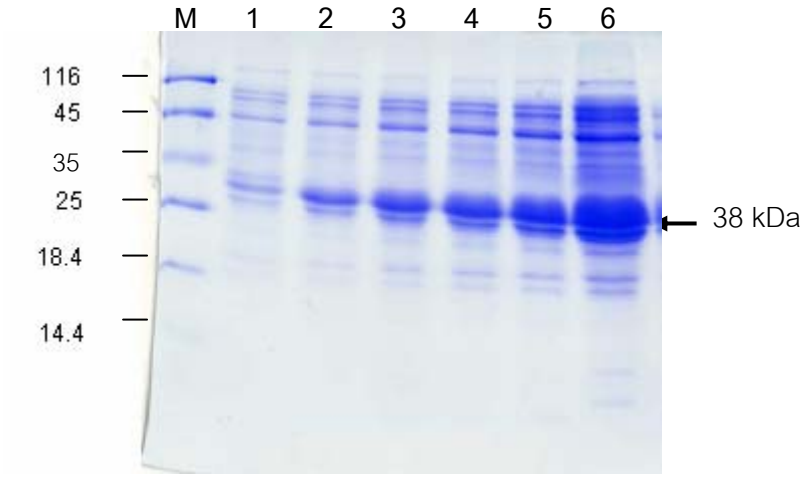


PWMaV2AF283103+132

1041 bp

```
      NcoI
                        ~~~~~~~
       M  H  H  H  H  H  H   G  A  G   G  C  C  P   G  C  C   G  G  G
   1   ATGCATCATC ACCATCACCA TGGTGCTGGT GGCTGTTGTC CTGGCTGTTG CGGTGGCGGC
       TACGTAGTAG TGGTAGTGGT ACCACGACCA CCGACAACAG GACCGACAAC GCCACCGCCG
       E  N  L  Y   F  Q  G   I  I  T   S  L  Y  K   K  A  G   S  A  A
  61   GAAAACCTGT ATTTTCAGGG AATTATCACA AGTTTGTACA AAAAAGCAGG CTCCGCGGCC
       CTTTTGGACA TAAAAGTCCC TTAATAGTGT TCAAACATGT TTTTTCGTCC GAGGCGCCGG
                  NcoI
                 ~~~~~~
       A  P  F  T   M  A  Q   N  Y  V   A  V  V  E   G  T  I   L  E  S
 121   GCCCCCTTCA CCATGGCTCA GAATTACGTA GCCGTAGTAG AAGGCACTAT TCTCGAAAGT
       CGGGGGAAGT GGTACCGAGT CTTAATGCAT CGGCATCATC TTCCGTGATA AGAGCTTTCA
       L  T  A  P   P  K  R   F  R  V   A  T  S  D   V  G  K   Y  Y  D
 181   TTGACGGCTC CACCTAAACG ATTTAGAGTG GCGACGTCTG ATGTGGGGAA ATATTACGAT
       AACTGCCGAG GTGGATTTGC TAAATCTCAC CGCTGCAGAC TACACCCCTT TATAATGCTA
       S  S  K  Y   R  S  V   T  G  V   A  T  A  E   R  D  R   L  P  A
 241   AGTAGCAAAT ACCGCTCTGT AACGGGCGTA GCTACAGCCG AGAGGGATCG GTTACCAGCG
       TCATCGTTTA TGGCGAGACA TTGCCCGCAT CGATGTCGGC TCTCCCTAGC CAATGGTCGC
                                          HindIII
                                          ~~~~~~~
       I  E  E  T   E  L  L   A  T  I   P  T  E  A   S  T  D   K  G  V
 301   ATAGAGGAAA CTGAACTATT GGCAACAATC CCAACGGAAG CTTCAACAGA TAAGGGTGTT
       TATCTCCTTT GACTTGATAA CCGTTGTTAG GGTTGCCTTC GAAGTTGTCT ATTCCCACAA
          AvaI
         ~~~~~~
       I  P  E  T   V  K  R   S  S  N   K  P  E  I   V  D  D   V  S  T
 361   ATTCCCGAGA CTGTTAAGAG GTCGAGTAAT AAACCAGAAA TAGTAGATGA TGTATCAACG
       TAAGGGCTCT GACAATTCTC CAGCTCATTA TTTGGTCTTT ATCATCTACT ACATAGTTGC
       L  L  L  N   P  R  K   N  V  V   L  N  I  G   S  V  K   T  V  P
 421   TTGCTGTTAA ATCCTAGAAA GAACGTTGTA CTAAATATTG GATCGGTTAA AACCGTGCCA
       AACGACAATT TAGGATCTTT CTTGCAACAT GATTTATAAC CTAGCCAATT TTGGCACGGT
                                     SmaI
                                    ~~~~~~~
                                     XmaI
                                    ~~~~~~~
                                     AvaI
                                    ~~~~~~~
       K  V  V  N   Q  P  G   L  I  S   R  E  I  A   I  R  I   G  E  A
 481   AAGGTAGTTA ATCAGCCGGG TTTGATATCC CGGGAGATTG CTATCCGTAT AGGAGAGGCT
       TTCCATCAAT TAGTCGGCCC AAACTATAGG GCCCTCTAAC GATAGGCATA TCCTCTCCGA
       L  K  E  H   C  K  Q   V  M  G   S  D  S  S   T  D  L   A  T  Y
 541   CTGAAGGAAC ATTGCAAACA AGTTATGGGT TCGGATAGTA GTACGGACTT AGCTACATAC
       GACTTCCTTG TAACGTTTGT TCAATACCCA AGCCTATCAT CATGCCTGAA TCGATGTATG
       F  I  H  L   I  Q  L   A  I  T   F  S  T  S   K  N  S   E  Y  K
 601   TTTATACATT TGATTCAACT CGCTATTACG TTCTCTACAT CCAAAAATAG CGAATACAAA
       AAATATGTAA ACTAAGTTGA GCGATAATGC AAGAGATGTA GGTTTTTATC GCTTATGTTT
       E  F  D  Y   I  E  T   E  T  Q   K  K  I  Y   I  K  D   V  S  E
 661   GAGTTTGACT ATATAGAAAC AGAGACGCAA AAGAAAATAT ACATCAAGGA CGTGAGTGAG
       CTCAAACTGA TATATCTTTG TCTCTGCGTT TTCTTTTATA TGTAGTTCCT GCACTCACTC
                             EcoRI
                             ~~~~~~
       V  V  E  R   A  A  M   N  S  G   Y  E  N  P   F  R  Q   Y  M  R
 721   GTGGTTGAGA GAGCGGCGAT GAATTCGGGG TACGAAAACC CGTTTAGGCA ATATATGCGT
       CACCAACTCT CTCGCCGCTA CTTAAGCCCC ATGCTTTTGG GCAAATCCGT TATATACGCA
                  AvaI
                 ~~~~~~
       Y  F  T  S   S  S  I   T  L  T   L  N  G  K   I  T  P   N  E  R
 781   TATTTTACAA GCTCGAGTAT AACACTAACT TTAAATGGTA AAATAACACC TAACGAGAGA
       ATAAAATGTT CGAGCTCATA TTGTGATTGA AATTTACCAT TTTATTGTGG ATTGCTCTCT
       T  M  A  H   H  G  V   P  K  Q   F  F  A  Y   T  Y  D   F  I  D
 841   ACTATGGCTC ATCACGGAGT ACCCAAGCAG TTCTTTGCAT ATACTTACGA TTTTATTGAC
       TGATACCGAG TAGTGCCTCA TGGGTTCGTC AAGAAACGTA TATGAATGCT AAAATAACTG
       P  D  Y  S   L  M  N   H  S  A   I  N  A  Y   N  L  T   R  I  Q
 901   CCCGACTATA GCCTCATGAA TCATTCGGCG ATTAATGCTT ACAACTTAAC GAGGATTCAA
       GGGCTGATAT CGGAGTACTT AGTAAGCCGC TAATTACGAA TGTTGAATTG CTCCTAAGTT
       A  F  K  N   K  I  A   S  V  N   N  T  M  H   N  T  Y   Q  L  N
 961   GCATTTAAGA ATAAGATAGC TTCAGTGAAC AATACTATGC ATAACACATA CCAGCTGAAC
       CGTAAATTCT TATTCTATCG AAGTCACTTG TTATGATACG TATTGTGTAT GGTCGACTTG
       Q  G  A  V   S  G  *
1021   CAGGGAGCTG TTTCAGGGTA G
       GTCCCTCGAC AAAGTCCCAT C
```

ภาพที่ 4. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (909 bp) + Lumio tag 132 bp

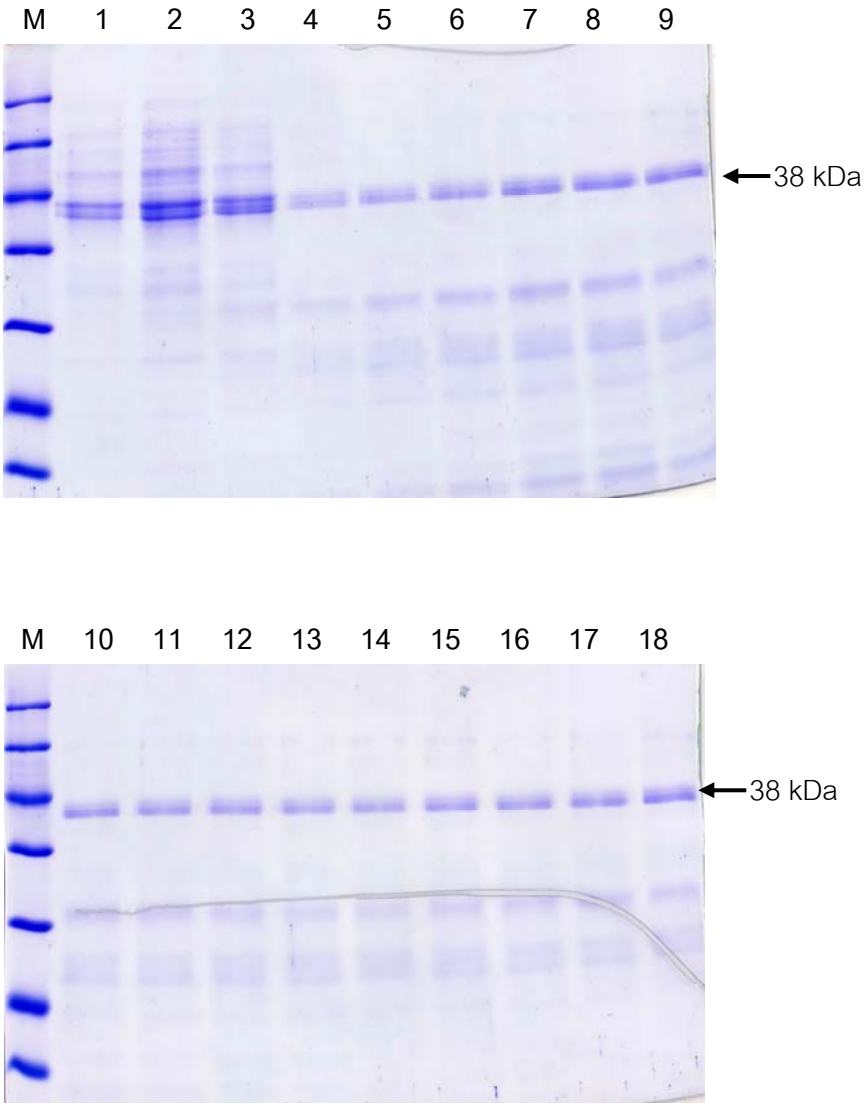


ภาพที่ 5 ผลการชักนำให้สร้างโปรตีนในพลาสมิดสายผสม pET 160/GW/D-TOPO®-*cp* ด้วยสาร IPTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1 : โปรตีนที่แยกได้ก่อนการชักนำด้วย IPTG

2-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังการชักนำ 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 ปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์ได้หลังจากผ่าน Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

M : โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)

1-5 : โปรตีนที่แยกได้หลังจากล้าง column ด้วย washing buffer

6-18 : โปรตีนที่แยกได้ในแต่ละ fraction ตั้งแต่ 1-18 หลังการใช้ eluting buffer

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

นำใบสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จากส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่Lumi_PMWaV2F (5' CACCGCTCA GAATTACGTAGCCGTAGTAGA 3') และ Lumi_PMWaV2R (5' CCCTGAAACAGCTCCCTG GTTCAGCT 3') สังเคราะห์ ได้ชิ้นของดีเอ็นเอ ขนาด 909 คู่เบส จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่ cloning vector (pCR®8/GW/TOPO® , Invitrogen) และคัดเลือกเฉพาะโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปใน vector นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Miniprep แล้วส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 909 คู่เบส หลังจากนั้น subclone ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV-2 เข้าสู่ protein expression vector (pET160/GW/D-TOPO® , Invitrogen) ซึ่งมีขนาด 5.8 กิโลเบส และ transform เข้า *E. coli* Top 10 ตรวจพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1041 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-2 ขนาด 909 คู่เบส + Lumio tag 132 คู่เบส ขณะนี้กำลังดำเนินการคัดเลือกโคลนที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ในเซลล์ของ *E. coli* BL 21 (DES 3) ในอาหาร 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร และใช้สาร Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในการชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน พบว่าระยะเวลาที่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้สูงสุด คือ 24 ชั่วโมง โดยให้โปรตีนที่มีขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน จากการตรวจปริมาณโปรตีนทีหลังการแยกให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ปรากฏว่า เริ่มพบ band ขนาด 38 กิโลดาลตันทุก fraction และ พบว่า โปรตีนสามารถผ่าน column Ni-NTP ได้น้อยมาก ขณะนี้กำลังทำการปรับ pH ของบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA เพื่อไม่ให้โปรตีนถูกชะล้างไปในขั้นตอนของการล้าง column

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.

ลำพึง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมเข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิขาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. หน้า 110-117.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช (17) 1-2 : 48-53.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort*. (ISHS) 334:383-386.

Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of *Potato mop-top virus. Journal of Phytopathology* 151 (4) : 195-200.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric*. 29: 337-348.

Druka, A., T. Burns, S. Zhang and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J. Gen. Virology*. 77: 1975-1983.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Hu, J.S., D.M. Sether and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology* . 45: 829-836.

Nickel Osmar, Maria, L.P.N. Targon, Thor V.M. Fajardo, Marcos A. Machado and A. Trivilin. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli* : production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29 (5) : 558-562.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology*. 92: 928-935.

การตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus

Detection of mosaic disease of orchids cause by Potyvirus

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/] สุรภี กีรติยะอังกูร[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ออนซิเดียม (*Oncidium*) แวนด้า (Vanda) ช้างแดง ช้างพลาย (Rhynchostylis) และกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) มอคคาล่า ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้เทคนิค Brandes' dip พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนตรงสั้น (stiff rod) (ขนาด300 นาโนเมตร) ทำการพิสูจน์เชื้อพบว่าเป็น ORSV และพบเชื้อไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดความยาว 550- 650 และ 750-900 นาโนเมตร รวมปะปนกัน ได้ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี Immuno electron microscope (IEM) และตรวจด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) พบว่าตัวอย่างไวรัสทั้งหมดเป็น CyMV เนื่องจากอนุภาคไวรัสทั้งหมดถูกเคลือบด้วย IgG ของ CyMV แต่ไม่เคลือบด้วย IgG ของ MAb Poty1 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ ORSV และ CyMV แต่ให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับ IgG ของ MAb-Poty1 ในวิธี NCM-ELISA ส่วนการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบและพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa, Capsicum annuum, Lycopersicon esculentum* ซึ่งเป็นลักษณะของ Potyvirus บนกล้วยไม้ แต่จะพบอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบพืชทดสอบ ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อ CyMV ซึ่งจากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้เพื่อหาเชื้อกลุ่ม Potyvirus ทั้ง 3 วิธีจึงสรุปได้ว่ายังไม่พบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้ระบาดในประเทศไทย

รหัสโครงการ 09-01-49-02-03-04-06

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ บางประเทศมีข้อกำหนดให้มีใบรับรองการปลอดเชื้อไวรัส มากกว่า 2 ชนิด ของ CyMV และ ORSV บางประเทศต้องการการปลอดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วย บริษัทหลายแห่งผู้รับปั่นตาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้กับลูกค้าที่ส่งมาจากประเทศในยุโรป มีความต้องการให้ช่วยตรวจสอบต้นพันธุ์เพื่อคัดเลือกให้ปลอดเชื้อจาก CyMV , ORSV , Potyvirus และ Tospovirus ซึ่งมีรายงานการศึกษาโดย Franki (1985) พบว่าเชื้อไวรัสอีกชนิดที่ทำให้กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium* spp. มีอาการด่างคือเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus เป็น *Dendrobium Mosaic Virus* (DeMV) ซึ่งมี coat protein gene ขนาด 1,143 bp สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้ จากตัวอย่างที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเป็นพันธุ์ Dendrobium, Oncidium, Phalaenopsis และ Grammatophylum พบอาการด่าง แต่ตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบของเชื้อ CyMV และ ORSV แล้วพบว่าเกิดจากเชื้อ ทั้ง 2 ชนิดนี้ และพบเป็นเชื้อไวรัสที่มีอนุภาคเป็นท่อนยาวคดประมาณ 750 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเชื้อ CyMV ที่มีขนาดตั้งแต่ช่วง 550-900 นาโนเมตร แต่อนุภาคขนาด 750-900 นาโนเมตร มีจำนวนน้อยเพียง ซึ่งแนวทางในการศึกษาเพื่อการจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุของอาการด่างที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อ CyMV และ ORSV โดยการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบของไวรัสทั้งสองชนิด แล้วยังต้องหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Potyvirus ออกจากเชื้อ CyMV ให้ชัดเจนเพื่อการป้องกันกำจัดและป้องกันเชื้อกลุ่ม Poryvirus เข้ามายังประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra centrifuge
- Spectrophotometer
- แอนติซีรัม monoclonal antibody ของเชื้อกลุ่ม Potyvirus (MAb-Poty) virus
- ตู้แช่แข็ง -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และเตรียมแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการ จากแปลงปลูกกล้วยไม้รวมทั้งตัวอย่างนำเข้าในพื้นที่ต่างๆ มาศึกษาลักษณะอาการ และสั่งซื้อแอนติซีรัม monoclonal antibody ของเชื้อกลุ่ม Potyvirus (MAb-Poty) ซึ่งมีคุณสมบัติในการตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม 300 ช่องต่อตารางนิ้ว) มาคว่ำลงบนน้ำคั้นทิ้งไว้ 1 นาที ใช้คีมคีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริด หยดน้ำกลั่นลงบนกริดเพื่อชะล้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่นเกลือต่างๆออกไป ทำการย้อมสีแบบ negative staining ซึ่งเป็นการย้อมสีพื้นที่รอบๆอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย 2% Phosphotungstic acid (PTA) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.2 ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี IEM (Immuno electron microscope)

นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่ตรวจพบอนุภาค 550-900 นาโนเมตร มาตรวจสอบด้วยวิธี IEM โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ ได้น้ำคั้นพืช นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (300 ช่องต่อตารางนิ้ว) ที่เคลือบด้วย colloidien และ carbon พร้อมใช้ มาคว่ำลงบนน้ำคั้น 6 กริด ทิ้งไว้ 1-3 นาที ใช้ Forceps คีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริดออก หยดน้ำกลั่นลงบนกริด 10 หยด เพื่อชะล้างเศษพืชชิ้นใหญ่ออกไป แล้วนำกริดไปคว่ำลงบนหยด IgG ของ CyMV และ MAb Poty1 แยกกัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้อมสีด้วยการหยดสารละลาย 2% Uranyl acetate ผ่านหน้ากริด 10 หยด แล้วหยดน้ำกลั่นล้างผ่านหน้ากริด 10 หยด ซับรอบกริดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3. ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN_3, 0.2% Na_2SO_3, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N+ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ Potyvirus ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือ

จางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ) รอดูผลของปฏิกิริยา ประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

4. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและการแยกเชื้อ Potyvirus โดยใช้พืชทดสอบ

นำตัวอย่างที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบแต่เชื้อ CyMV ที่มีขนาดอนุภาค 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร นำมาปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ *Nicotiana benthamiana, Chenopodium quinoa* พริกและมะเขือเทศ เพื่อแยกเชื้อ Potyvirus ออกจาก CyMV โดยนำตัวอย่างใบกล้วยไม้ผสมกับ sodium phosphate buffer pH 7.5 แล้วบดให้ละเอียด นำน้ำคั้นมาทาลงบนใบพืชทดสอบ ที่โรยผงซีไลท์ (celite) นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนทดลองเป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบอาการของพืชทดสอบเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และเตรียมแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้

ได้ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ออนซิเดียม (*Oncidium*) แวนด้า (Vanda) ช้างแดง ช้างพลาย (Rhynchostylis) และกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) มอคคาล่า จากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดสระบุรี จังหวัดนนทบุรี จำนวนทั้งสิ้น 237 ตัวอย่าง และได้สั่งซื้อแอนติซีรัม monoclonal antibody ของเชื้อกลุ่ม Potyvirus (MAb-Poty) ซึ่งมีคุณสมบัติในการตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ได้หลายชนิดจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ผลิตโดย ดร. อรประไพ คชนันทน์ (MAb-Poty1) และ บริษัท AGDIA จำกัด (MAb-Poty2) MAb ของ Potyvirus จากบริษัท AGDIA มีรายงานจากทางบริษัทว่าสามารถใช้ตรวจสอบจำแนก

เชื้อ *Dendrobium mosaic virus* (DeMV) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตรวจสอบ *Ceratobium mosaic virus* (CeMV) ไวรัสกลุ่ม potyvirus ในประเทศออสเตรเลีย และตรวจสอบ *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV) ในกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ในไต้หวัน

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยได้นำตัวอย่างกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆจำนวน 237 ตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าการตรวจดูด้วยกล้องนั้น แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ด้วยกัน ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างที่พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนตรงสั้น (stiff rod) มีขนาดความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร เพียงชนิดเดียว เป็นอนุภาคของเชื้อ ORSV

กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาวประมาณ 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร รวมอยู่กับอนุภาคของ ORSV ขนาด 300 นาโนเมตร

กลุ่มที่ 3 เป็นอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) ที่มีขนาดอนุภาค 550- 650 และ 750-900 นาโนเมตร ไม่มี ORSV ปน

2.2 ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี Immuno electron microscope (IEM)

เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคทั้งหมดที่มีขนาด 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร ถูกเคลือบด้วย IgG ของ CyMV แต่ไม่เคลือบด้วย IgG ของ MAb Poty1 จึงสรุปได้ว่าเชื้อที่พบเป็น CyMV ทั้งหมด และมีขนาดตั้งแต่ 550-900 นาโนเมตร

3. ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

แผ่นตัวอย่างกล้วยไม้ที่ตรวจพบอนุภาคท่อนตรงยาว 300 นาโนเมตรซึ่งเป็นกลุ่มแรก เกิดปฏิกิริยากับ IgG ของ ORSV กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่พบอนุภาค 300, 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ ORSV และ CyMV แต่ให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับ IgG ของ MAb-Poty1 ส่วนกลุ่มที่ 3 ที่พบอนุภาคขนาด 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ CyMV ให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับ IgG ของMAb-Poty1 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอนุภาคไวรัสที่พบในกลุ่ม 3 เป็น CyMV

4. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและการแยกเชื้อ Potyvirus โดยใช้พืชทดสอบ

เมื่อนำน้ำคั้นมาทาลงบนใบพืชทดสอบที่โรยด้วยผงซีไลท์ (celite) และทำการตรวจสอบอาการต้นพืชทดสอบในเรือนทดลอง หลังจากปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 2 เดือน จากผลการทดลอง ตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบและพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด ของ Potyvirus ของกล้วยไม้ ซึ่งพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อแล้ว พบอาการดังนี้คือ

Nicotiana benthamiana เกิดจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ หลังปลูกเชื้อแล้ว 7-11 วัน ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อ CyMV เพราะถ้าเกิดจากเชื้อที่เป็น Potyvirus จะแสดงลักษณะอาการด่างเป็น systemic symptom

Chenopodium quinoa หลังปลูกเชื้อได้ 11-14 วัน จะมีอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ ซึ่งเกิดจากเชื้อ CyMV ทั้งหมด แต่ถ้าเป็นอาการที่เกิดจาก Potyvirus จะเกิดอาการด่างเป็น systemic symptom

Capsicum annuum จะไม่พบลักษณะผิดปกติและไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ CyMV บนต้นพืชทดสอบ เนื่องจาก *C. annuum* ไม่ใช่พืชอาศัยของ CyMV เพราะถ้าเป็นเชื้อ Potyvirus จะต้องเกิดอาการด่างเป็น systemic symptom บนต้นพืชทดสอบดังกล่าว

Lycopersicon esculentum ไม่พบลักษณะผิดปกติและอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ CyMV บนต้นพืชทดสอบ เพราะ *L. esculentum* ไม่ใช่พืชอาศัยของ CyMV จึงไม่เกิดอาการด่างเป็น systemic symptom บนพืชทดสอบให้เห็น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดลองที่ทำการศึกษาบนกล้วยไม้ โดยวิธี NCM-ELISA, IEM และการใช้พืชทดสอบ สรุปได้ว่าสามารถที่จะนำมาใช้ตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ Potyvirus บนกล้วยไม้ได้ โดยวิธี NCM-ELISA สุรภีและคณะ (2534) ได้รายงานไว้ถึงการผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ ORSV และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ ORSV ด้วยวิธี ELISA ในกล้วยไม้และได้พัฒนาปรับวิธี ELISA ให้เป็นเครื่องมือภาคสนามสำหรับตรวจไวรัสของกล้วยไม้ได้ รวมทั้ง Banttarri และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาใช้วิธี Dot-ELISA มาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสของมันฝรั่ง PVX PVY และ PVS โดยใช้แผ่น NCM เป็นวัสดุรองรับปฏิกิริยา และได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆ ชนิดด้วยวิธีรวดเร็ว (multi RIPA) เพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test (Tsuda *et al.*,1993) และ Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา ซึ่งการศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Potyvirus นี้สามารถใช้วิธีการและแอนติซีรัมดังกล่าวในการ

ตรวจสอบได้ โดยการตรวจสอบ Potyvirus ของกล้วยไม้นั้น มีการใช้ MAb ของ Potyvirus ทั้งของ สวทช. และ AGDIA ในการตรวจจำแนกเชื้อ Potyvirus ออกจาก CyMV ได้ และจากการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี IEM ซึ่งเชื้อไวรัสที่พบมีขนาด 750-900 นาโนเมตร ปะปนอยู่กับเชื้อ CyMV นั้น พบว่าเป็นอนุภาคของเชื้อ CyMV ที่มีขนาดตั้งแต่ 550-900 นาโนเมตร ซึ่ง I Wayan และคณะ (1996) ได้รายงานว่าอนุภาคของไวรัส CyMV มีขนาดระหว่าง 75-950 นาโนเมตร จากการวัดอนุภาคไวรัส CyMV ทั้งหมด 300 อนุภาค นอกจากนั้น MAb ยังสามารถตรวจเชื้อ PhCSV ในกล้วยไม้นำเข้าของไต้หวันได้อีก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถตรวจสอบหาเชื้อ Potyvirus ได้ด้วยวิธี IEM, NCM-ELISA ด้วย MAb ของ Potyvirus นอกจากนั้นการใช้พืชทดสอบเพื่อศึกษาถึงการถ่ายทอดเชื้อในพืชตระกูล Solanaceae (*Nicotiana benthamiana, Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum*) และ *Chenopodium quinoa* โดยแสดงอาการด่างเป็น systemic symptom

ดังนั้นจากการศึกษาทดลองกล้วยไม้ ที่ได้เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกตามแหล่งต่างๆ มาทำการตรวจสอบนั้นจึงสรุปได้ว่ายังไม่พบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้ระบาดในประเทศไทย และสามารถนำ MAb ของ Potyvirus ทั้งของ สวทช. และ AGDIA มาใช้ในการตรวจจำแนกเชื้อ Potyvirus ออกจาก CyMV ได้

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2534. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบเชื้อ TMV-O ของกล้วยไม้พันธุ์หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2534. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-8.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 115-122.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2534. เครื่องมือสนามสำหรับตรวจไวรัสของกล้วยไม้. หนังสือพิมพ์กสิกร ปีที่ 64 ฉบับที่ 4 หน้า 367-371.

Banttarri, E. E., and Goodwin, P. H. 1985. Detection of Potato Viruses S , X and Y by Enzyme-linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membrane (Dot-ELISA). Plant Disease. 69: 202-205.

Hochleitner, K. and Kraus, H. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180 pp.

I Wayan, G., Hideki, K., Takanori, M., Koji, M. and Narinobu, I. 1996. Further Characterization of Cymbidium Mosaic Virus from *Vanda* Orchid. Research Institute for Bioresources, Okayama University 4: 163-174.

Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Fujisawa, I. And Tomaru, K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plant Infected with Multiple Viruses Employing Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) with two step Method; Multi RIPA. Annaul Phytopathology Society. Japan 59: 200-203.

วิธีการตรวจสอบราสาเหตุโรค Black spot ของส้มโอโดยเทคนิค PCR

Detection of Black Spot Disease on Pummelo by Polymerase Chain Reaction (PCR)

พรพิมล อธิปัญญาคม[1] สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1] ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช[2]
[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

ส้มโอเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญต่อการส่งออกพืชหนึ่งในประเทศไทย ในปี 2549 ได้พบการระบาดของโรคจุดดำบนผลส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย ซึ่งเป็นแหล่งผลิตส้มโอเพื่อการส่งออกเนื่องจากเป็นพื้นที่ที่ปลอดโรคแคงเคอร์ของส้ม โรคนี้เป็นโรคที่สำคัญสำหรับการส่งออกของส้มโอ เนื่องจากประเทศที่นำเข้าส้มโอไม่ยอมรับส้มโอที่แสดงอาการของโรคจุดดำ วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ ผลการทดลองจากการแยกเชื้อจากอาการของจุดดำส้มโอตามลักษณะอาการต่าง ๆ แยกได้ทั้งหมด 65 isolates จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa* 5 isolates โคโลนีของราเจริญช้า, *G. mangiferae* 27 isolates โคโลนีของราเจริญเร็ว และ Unidentified *Phyllosticta* 33 isolates และจากการตรวจสอบรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ และรา *G. mangiferae* ซึ่งมีลักษณะเป็นเอ็นโดไฟท์บนพืช โดยการใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5' TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) ได้นำมาทดสอบเพื่อการนำไปใช้ในตรวจสอบราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอเพื่อการส่งออก โดยการทดสอบกับดีเอ็นเอของราในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย ความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR และไพร์เมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจสอบรา *G. mangiferae* ได้ในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ประมาณ 226 คู่เบส และจากการวิเคราะห์ปฏิกิริยา PCR ของสปอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอของส้มโอปกติที่ความเข้มข้น 70 ng พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบได้กับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *G. mangiferae* ที่ระดับ 40 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุด แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบรา *G. citricarpa* ได้

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-03-04-13-51

คำนำ

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burn) Merr.] เป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออกและยังเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ให้ผลผลิตและผลตอบแทนสูงเนื่องจากสามารถปลูกได้ในดินเกือบทุกชนิด ให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี และสามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน เกษตรกรจึงนิยมปลูกส้มโอเพื่อการบริโภคในครัวเรือนและปลูกเป็นการค้ากันมาก และเนื่องจากส้มโอเป็นไม้ผลที่มีศักยภาพในการส่งออก จึงทำให้ส้มโอเป็นไม้ผลส่งออกที่สำคัญของประเทศไทยชนิดหนึ่ง สำหรับตลาดส่งออกที่สำคัญได้แก่ มาเลเซีย ฮ่องกง และสิงคโปร์ การส่งออกส้มโอของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในปี 2548 มูลค่าการส่งออกส้มโอมีปริมาณ 6,293 เมตริกตัน มีมูลค่าเท่ากับ 99,673,000 บาท และในปี 2549 มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มเป็นจำนวน 9,387 เมตริกตัน มีมูลค่าเท่ากับ 132,905,000 บาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2549) เห็นได้ว่าส้มโอมีแนวโน้มในการส่งออกมากขึ้นอย่างไรก็ตามประเทศในสหภาพยุโรป อเมริกา ญี่ปุ่น และ ออสเตรเลีย มีความต้องการส้มโอจากประเทศไทย แต่ประเทศไทยไม่สามารถส่งออกส้มโอไปยังประเทศดังกล่าวได้เนื่องจากประสบปัญหาเรื่องของโรคแคงเกอร์ (canker) และโรคจุดดำ (black spot) สำหรับโรคแคงเคอร์ ในปัจจุบันกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ดำเนินการตรวจรับรองสวนส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย เป็นโครงการนำร่องเพื่อการส่งออกไปประเทศเนเธอร์แลนด์ สำหรับโรคจุดดำนั้นยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับโรคนี้มากนัก

ราสกุล *Guignardia* Viala & Ravaz อยู่ใน Class Ascomycetes, Order Sphaeropsidales, Family Mycosphaerellaceae มีรา *Phyllosticta* Pers เป็น Anamorphic state อยู่ใน Class Coelomycetes ส่วนใหญ่ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืช *Guignardia citricarpa* สาเหตุโรค Black spot ของพืชตระกูลส้ม เป็นเชื้อสำคัญในการกักกันพืช ของประเทศในเขตยุโรป และอเมริกา ซึ่งห้ามนำเข้าผลไม้ที่มีอาการของโรค Black spot โดยเด็ดขาด (Baayen และคณะ, 2002) ปัญหาอีกประการหนึ่งของการตรวจพืชกักกันเพื่อการนำเข้าและส่งออก ลักษณะของแผลมีลักษณะหลายชนิด เช่น hard spot lesions แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรงกลางมีสีเทาถึงสีแทน ขอบแผลมีสีน้ำตาลดำ ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-10 มิลลิเมตร มักแสดงอาการเมื่อผลส้มใกล้เปลี่ยนสีเป็นสีส้มหรือเหลือง ปกติมักพบ pycnidia เล็ก ๆ บนแผล ภายในสร้าง conia ของรา *Phyllosticta citricarpa* เป็น anamorph stage (Sutton and Waterson, 1966; Van der Aa, 1973) ซึ่งสามารถมองเห็น pycnidia ด้วยตาเปล่าและสามารถตรวจสอบได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ลักษณะแผล hard spot lesions ที่รุนแรงมากแผลจากจุดเล็ก ๆ จะมารวมตัวกัน ขยายใหญ่ขึ้น และมักพบ pycnidia บนแผลมากมาย อาการอีกชนิดหนึ่งคือ freckle spot หรือเรียกว่า false melanose แผลจุด เล็ก ขนาดแผลมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร แผลบุ๋มลงไป ไม่ลึก เป็นจุดเล็ก ๆ ตรง

กลางมีสีเทา แทน น้ำตาลแดง บริเวณรอบแผลลักษณะนี้ก็มักพบแผล hard spot lesions กระจายอยู่ แต่อย่างไรก็ตามอาการทั้งสองนี้ไม่แตกต่างกันมาก ในปัจจุบันประเทศ EU ตรวจสอบราสาเหตุโรค black spot โดยการนำแผลที่ไม่พบการสร้าง pycnidia ของเชื้อไปบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน เชื้อจะสร้าง pycnidia ขึ้นมา หลังจากนั้นต้องนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อศึกษาลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่างของรา *G. citricarpa* (pathogenic) และ *G. mangiferae* (non pathogenic) เชื้อทั้งสองมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายกันมากจึงมักทำให้การจัดจำแนกชนิดผิด (Glienke-Blanco และคณะ, 2002; Baayen และคณะ, 2002) เชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อช้า โดยใช้เวลา 14 วัน จึงจะสร้าง mature pycnidia ดังนั้นวิธีนี้ จึงไม่สะดวกในการตรวจพืชนำเข้า และส่งออกด้วยวิธีนี้ ในปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรค black spot โดยใช้การใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecule biology) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและความไวสูง และสามารถใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเพียงปริมาณน้อยก็สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้ การศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนา วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการตรวจสอบและวินิจฉัยโรค black spot ของส้มโอให้มีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ

ในประเทศไทย พรพิมลและคณะ (2550) ได้พบการระบาดของโรคจุดดำบนผลส้มโอพันธุ์ทองดี ขาวไหญ่ และพวงชมภู ที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย และส้มโอพันธุ์ทองดี อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม ในปี 2549-2550 ทำการแยกเชื้อสาเหตุแยกจากส่วนที่แสดงอาการของโรคและมีจุดดำอยู่ตรงกลางโดยวิธี tissue transplanting บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ ราที่แยกได้จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรค black spot ของส้มโอ และราที่แยกได้จากพืช

2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Tris-HCl , EDTA, NaCl, SDS, sodium acetate, chloroform : isoamylalcohol, ethanol, PCR buffer, $MgCl_2$, dNTP, Taq DNA polymerase

5. เอ็นไซม์ที่ใช้ในการตัดสาย และเชื่อมสายดีเอ็นเอ

6.วัสดุเครื่องแก้วต่างๆ เช่น จานเพาะเลี้ยง,บิกเกอร์, กระบอกตวง, flask, slide และ coverslip เป็นต้น

7. วัสดุวิทยาศาสตร์ เช่น โกร่งบดสาร, หลอด centrifuge, หลอด PCR, QIAquick Gel Extraction Kit

8. ครุภัณฑ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้มีดังนี้ เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA, เครื่อง centrifuge, เครื่อง electrophoresis, UV transilluminator, เครื่องวัดสารละลาย DNA, vortex mixer, ตู้เขี่ยเชื้อ, กล้องจุลทรรศน์, Refrigerated incubator shaker, ตู้เย็น 4°C และ ตู้เย็น -20°C

วิธีการ

1. การแยกและจำแนกเชื้อสาเหตุ

- <u>ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุโดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์</u>

ศึกษาลักษณะของเชื้อสาเหตุภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo โดยใช้เข็มเขี่ย เขี่ยส่วนของจุดสีดำที่อยู่ตรงกลางแผลมาวางบนสไลด์ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ และนำมาวางบนสไลด์ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound ถ่ายรูปลักษณะเชื้อและบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ

- <u>แยกเชื้อสาเหตุโดยวิธี tissue transplanting</u>

นำส่วนของส้มโอที่เป็นโรคที่มีจุดแผลสีดำอยู่ตรงกลางมาตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร จำนวน 40 ชิ้น ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที ล้างในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำไปซับบนกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้แห้ง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยวางชิ้นส่วนพืช 4 ชิ้น ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ นาน 3-7 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ และเลี้ยงบนอาหาร PDA

- <u>การจำแนกชนิดรา *Guignardia citricarpa*</u>

ศึกษารูปร่างลักษณะของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo, compound microscope และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope) โดยตรวจดูลักษณะ fruiting body และสปอร์ และศึกษาลักษณะของสปอร์และโครงสร้างอื่น ๆ ของรา โดยการ mount slide ด้วยน้ำหรือ shear's solution

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ ขนาด สี ชนิดของ fruiting body ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound บันทึกขนาด รูปร่าง วาดภาพ และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพ และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning Electron Microscope) นำลักษณะของราดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกรานี้ (McAlpine, 1899; Kiely, 1949; Sutton และ Waterston (1966); Van der Aa, 1973; Punithalingam, 1974; Baayen และคณะ, 2002)

2. การเตรียมเชื้อ:

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากอาการแผลโรคจุดดำต่ละลักษณะอาการ แผลที่ยังไม่เกิดจุดดำ แผลแสดงอาการจุดดำ เป็นต้น บนอาหาร PDA สังเคราะห์ นาน 7-14 วัน

3. การสกัดดีเอ็นเอของรา

นำราที่เลี้ยงไว้ในข้อ 2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการดัดแปลงของ Everett and Rees-Georgr (2006) โดยการดัดแปลงวิธีของ Everett and Rees-Georgr (2006) ใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1-2 มิลลิลิตรลงไปในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อไว้แต่ละสายพันธุ์ ขูดสปอร์และเส้นใยของเชื้อบนอาหารออกมาโดยใช้แท่งแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อ ล้างเส้นใยและสปอร์ให้สะอาด หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของอาหาร และนำไปบดให้ละเอียด จากนั้นย้ายส่วนที่ได้ไปยัง microtube1.5 ml เติมบัฟเฟอร์ (150 mw EDTA pH 8, 5 mM tris pH 8, 1%SDS) และใส่ RNase (10 ไมโครกรัม) ปั่นและบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมบัฟเฟอร์ 130 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่ใน QIAshredder Mini Spin Column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายส่วนใสใส่ใน microtube ใหม่ เติม 1.5 เท่าบัฟเฟอร์ ผสมเบา ๆ ด้วยปิเปต ใส่ใน DNeasy Mini Spin Column ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร ใน DNeasy Mini Spin Column อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ย้ายส่วนของ DNeasy Mini Spin Column ใส่ใน microtube ใหม่ เติมบัฟเฟอร์ (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทำซ้ำโดยการเติมบัฟเฟอร์ (65 องศาเซลเซียส) 100 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ได้เดีเอ็นเอเพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป

4. การตรวจสอบเชื้อ

นำดีเอ็นเอของรา *G. citricarpa* ที่สกัดจากสปอร์และเส้นใย ทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 นาโนกรัม ของดีเอ็นเอต้นแบบ 0.5 µM ของไพรเมอร์ (ITS1 และ ITS4), 400 µM dNTP, 1unitTaq DNA Polymerase buffer และ 3mM $MgCl_2$ ในปริมาตรรวม 2.5 ไมโครลิตร

PCR program เริ่มต้นด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ตามด้วย อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จำนวน 30 รอบ และตามด้วยอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผลผลิต PCR ที่ได้นำมาตรวจด้วย gel elrctrophoresis บน 1% agarose gel ใน 1X TAE buffer pH 8.5

5. การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR โดยการผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G. mangiferae* ที่ความเข้มข้น 20 ng, 400 pg, 40 pg และ 4 pg เทียบกับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และรา *G. mangiferae* 40 ng ทำปฏิกิริยาโดยใช้ PCR program ตามข้อ 4

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น – สิ้นสุด ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1 การแยกและจำแนกเชื้อสาเหตุ

จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อและศึกษาลักษณะต่าง ๆ จากแผลที่มีจุดดำอยู่ตรงกลางเท่านั้น จากการตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ compound พบว่าจุดดำที่อยู่ตรงกลางแผล เป็น fruiting body ของราที่เรียกว่า pycndia และมี conidia เกิดอยู่ภายใน ผลการศึกษาการแยกเชื้อสาเหตุโรคจุดดำ โดยนำส่วนของผลส้มโอที่แสดงอาการโรคมาทำการแยกเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ PDA จำนวนอย่างละ 40 ชิ้น พบว่าการแยกเชื้อสาเหตุโรคจากผลเบื้องต้นบนอาหาร PDA พบราที่มีโคโลนีสีเทาดำ เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือพบการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เนื่องจากอาจเป็นเพราะการซับชิ้นส่วนพืชไม่แห้ง หรือเกิดการปนเปื้อนจากเครื่องมือหรือเทคนิคการปฏิบัติงาน

ผลการศึกษาการจำแนกเชื้อสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ แยกได้ทั้งหมด 65 isolates จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa* 5 isolates โคโลนีของราเจริญช้า, *G. mangiferae* 27 isolates โคโลนีของราเจริญเร็ว และ Unidentified *Phyllosticta* 33 isolates โดยการศึกษาลักษณะบนอาหารสังเคราะห์ PDA ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี และลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะของ pycnidium, conidia, microcnidia หรือ spermatia ได้จำแนกราสาเหตุเป็น *Guignardia citricarpa* Kiely [anamorph: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างกับเอกสารที่ศึกษาการจำแนกของราชนิดนี้ (McAlpine, 1899; Kiely, 1949; Sutton และ Waterston (1966); Van der Aa, 1973; Punithalingam, 1974; Baayen และคณะ, 2002) ซึ่งมีลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

***Guignardia citricarpa* Kiely**

Anamorphic stage: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine)

= *Phoma citricarpa* McAlp

= *Phyllostictina citricarpa* (McAlp) Petrak

Spermatial stage: *Leptodothiorella* Spec.

โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 25 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 ± 5 องศาเซลเซียส โคโลนีเจริญเติบโตช้ามาก สีเทาดำ ด้านใต้วุ้นมีสีเทาดำ ขอบโคโลนีมีลักษณะเป็น lobe ราสร้าง pycnidia ประมาณ 8-10 วัน

ราสร้าง pycnidia ตรงกลางแผลบนผลส้มโอ รูปร่างกลม สีดำ เกิดเดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบรวมกันเป็นกลุ่ม เจริญฝังตัวอยู่ใต้เนื้อเยื่อพืช สีน้ำตาลดำ ขนาด 90-320 ไมโครมิเตอร์ มี papillate ขนาด 10-13 ไมโครมิเตอร์

conidiogenous cells รูปร่าง cylindrical มีขนาด 3.5-8.0 x 2.0-3.0 ไมโครมิเตอร์ conidia เกิดอยู่ที่ปลาย conidiogenous cells

conidia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง obovate –elliptical ขนาด 8 x 12 – 6 x 8 ไมโครมิเตอร์ conidia มีเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ มี oil drop ภายในสปอร์ ปลาย conidia มีลักษณะ truncate base มี apical appendage ยาวประมาณ 6-18 ไมโครมิเตอร์

spermatia ใส ไม่มีสี เซลล์เดียว ไม่มีผนังกั้น รูปร่าง dumb-bell ขนาด 5 – 8 x 1-1.5 ไมโครมิเตอร์ มี oil drop อยู่ภายในเซลล์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา *G. citricarpa* ได้มีการอธิบายลักษณะต่าง ๆ ของราชนิดนี้โดย (McAlpine, 1899; Kiely, 1949; Sutton และ Waterston (1966); Van der Aa, 1973; Punithalingam, 1974; Baayen และคณะ, 2002) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลักษณะของ colony, pycnidia, conidiogenous cells, conidia, spermatia มีลักษณะใกล้เคียงกับเอกสารอ้างอิงที่ได้กล่าวไว้ แต่อาจมีขนาดแตกต่างกันไปซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอุณหภูมิ อาหารสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกัน

จากการศึกษานี้ไม่พบ perithecia และ ascospores บนใบหรือผลที่เป็นโรค และไม่พบบนอาหารสังเคราะห์เช่นกัน จากการตรวจเอกสารพบว่าราชนิดนี้ก็ไม่สร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ (Baayen *et al*., 2002) ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อ เพราะราสกุลนี้บางชนิดสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารสังเคราะห์ได้ พรพิมล (2550) ศึกษาโรคผลจุดดำของฝรั่งสาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* Ullasa & Rawal (anamorph : *Phyllosticta psidiicola* (Petrak) Van der Aa พบรา *G. psidii* บนผลที่เป็นโรคและสามารถชักนำให้สร้าง ascospores บนอาหาร

yeast extract medium ได้ Baayen และคณะ (2002) ศึกษารา *Guignardia mangifera* (anamorphic state: *Phllosticta capitalensis*) ที่แยกได้จากส้มและเป็น nonpathogenic isolate พบว่าสามารถชักนำให้ราสร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งราดังกล่าวนี้สามารถแยกได้จากส้มเช่นกัน แต่ความแตกต่างที่สร้าง perithecia และ ascospores บนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้สำหรับการแยกระหว่าง *G. mangifera* และ *G. citricarpa* แต่ไม่ได้เป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนก

จากการตรวจเอกสารพบว่ารา *G. citricarpa* สร้าง perithecia และ ascospores บนใบของส้มที่ร่วงอยู่บนพื้นดิน และ ascospores นี้เป็น primary inoculum ในการเข้าทำลายใบและผลบนต้นเมื่อมีอุณหภูมิและความชื้นที่เหมาะสม เมื่อเข้าทำลายอยู่บนใบและผลแล้วจะสร้าง conidia ภายใน pycnidia (Kiely, 1948; 1949; Kotzé, 2000; Baayen *et al*., 2002) และจากการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บใบของส้มโอที่อยู่ใต้ต้นบนพื้นในช่วงเดือนกรกฎาคม 2550 มาตรวจใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo พบรา *Colletotrichum* sp. เป็นจำนวนมาก ไม่พบ ascospores ของรา *G. citricarpa* ที่เป็นดังนี้เนื่องจากใบส้มที่เก็บมาส่วนใหญ่อยู่ ในระยะที่เริ่มย่อยสลายและแปลงส้มโอที่เก็บมานี้ใต้ต้นส้มโอมีความชื้นมาก และ รา *Colletotrichum* sp. เจริญได้รวดเร็วกว่า และราสาเหตุโรคจุดดำเจริญช้า ดังนั้นจึงพบ *Colletotrichum* sp. เป็นจำนวนมาก เพราะฉะนั้นการศึกษา ascospores ของราชนิดนี้ที่พักตัวอยู่บนใบที่ร่วงหล่นบนพื้นก็มีความสำคัญ เนื่องจาก ascospores เป็น primary inoculum ที่เข้าทำลายใบและผลส้มโอ ทำให้ทราบช่วงระยะเวลาใดที่มีปริมาณของราสาเหตุอยู่บนพื้นดินมาก เพื่อเป็นข้อมูลและการพยากรณ์การระบาดของโรคนี้ได้ เพราะฉะนั้นการควบคุม โรคจุดดำของส้มโอที่ควรปฏิบัติในเบื้องต้นคือการเขตกรรมโดยการเก็บเศษใบไม้และผลที่ร่วงอยู่บนดินทิ้งไปเพื่อเป็นการลดปริมาณของ inoculums

2. การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

ผลของการตรวจสอบรา *G.citricarpa* และ *G.mangiferae* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC) พบว่า สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้จากดีเอ็นเอของ *G.mangiferae* โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 226 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Everett and Rees George (2006a) แต่จากการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาดีเอ็นเอของ *G. citricarpa* ได้ อาจเป็นเพราะราที่แยกได้นี้มีการเจริญของเชื้อช้ามาก จากการที่สกัดดีเอ็นเอนั้น พบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตามการทดลองของ Everett and Rees George (2006a) สามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาได้จากดีเอ็นเอของ *G.mangiferae* โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 501 คู่ เบส

3. การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา PCR ในการผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ngกับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G. mangiferae* พบว่าเมื่อผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติความเข้มข้น 70 ng กับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และผสมดีเอ็นเอของส้มโอปกติ ความเข้มข้น 7 ng กับดีเอ็นเอของรา *G. mangiferae* ที่ความเข้มข้น 20 ng, 400 pg, 40 pg และ 4 pg เทียบกับดีเอ็นเอของรา *G.citricarpa* และรา *G. mangiferae* 40 ng พบว่าสามารถตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาของรา *G. mangiferae* ได้ที่ระดับดีเอ็นเอของเชื้อที่น้อยที่สุดได้ที่ 40 pg

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการแยกเชื้อจากอาการของจุดดำส้มโอตามลักษณะอาการต่าง ๆ แยกได้ทั้งหมด 65 isolates จำแนกชนิดเป็นรา *Guignardia citricarpa* 5 isolates โคโลนีของราเจริญช้า, *G. mangiferae* 27 isolates โคโลนีของราเจริญเร็ว และ Unidentified *Phyllosticta* 33 isolates และจากการตรวจสอบรา *G. citricarpa* สาเหตุโรคจุดดำของส้มโอ และรา *G. mangiferae* ซึ่งมีลักษณะเป็น endophyte โดยการใช้เทคนิค Polymrerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (5’ TCCGTAGG TGAACCTGCGG) และไพรเมอร์ ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC) ได้นำมาทดสอบ เพื่อการนำไปใช้ในตรวจสอบราสาเหตุโรคจุดดำของส้มโอเพื่อการส่งออก โดยการทดสอบกับดีเอ็นเอของราในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย ความจำเพาะของปฏิกิริยา PCR และไพร์เมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจสอบรา *G. mangiferae* ได้ในระยะการเจริญของสปอร์และเส้นใย โดยมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ประมาณ 226 คู่เบส และจากการวิเคราะห์ปฏิกิริยา PCR ของสปอร์ที่ผสมกับดีเอ็นเอของส้มโอปกติที่ความเข้มข้น 70 ng พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบได้กับปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อ *G. mangiferae* ที่ระดับ 40 ซึ่งเป็นระดับต่ำสุด แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบรา *G. citricarpa* ได้ อย่างไรก็ตามควรทำการทดลองอีกครั้งเนื่องจากเชื้อสาเหตุที่ทำการศึกษาเป็นเชื้อที่ใหม่ การเจริญเติบโตช้าและเกิดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่นทำให้มีปัญหาในการสกัดดีเอ็นเอ

เอกสารอ้างอิง

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาศ ณ น่าน บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และ ไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Guignardia citricarpa*. หน้า 1-12. *ใน* การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยใต้ร่มพระบารมี” ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.

Baayen, R. ,P., Bonants, P. J. M., Verkley, G., Carroll, G. C., Van der Aa, H. A., Weerdt, M., van Brouweeershaven, I. R., Schutte, G. C., Maccheroni, W.,Jr., Glienke de Blanco, C., and Azevedo, J. L. 2002. Nonpathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*, identified as a cosmopolitant endophyte bof woody plants, G. *mangifera* (*Phyllosticta capitalensis*). Phytopathology 92:264-477

Bonants, P.J.M., G.C. Carroll, M. de Weerdt, I R van Brouwershaven and R.P. Baayen. 2003. Development and validation of a fast PCR-based detection method for pathogenic isolates of the citrus black spot fungus, *Guignardia citricarpa*/ European Journal of Plant Pathology, 109: 503-513.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006a. Reclassification of an isolate of *Guignardia citricarpa* from New Zealand as *Guignardia mangiferae* by sequence analysis. Plant Pathology 55: 194-199.

Everett, K.R., J. Ress-George. 2006b. Species-specific PCR primers for *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. New Zealand Plant Protection 59: 141-145.

Glienke-Blanco, C., Carlos Ivan Aguilar-Vidoso, Maria LÚcia Carneiro Vieira, Paulo Augusto Vianna Barroso and João LÚcio Azevedo. 2002. Genetic variability in the endophytic fungus *Guignardia citricarpa* isolated from citrus plants. Genetics and Molecular Biology, 25 (2): 251-255.

Gonzlez, M. S. and Rondn. 2005. First Report of *Guignardia psidii*, an Ascigerous State of *Phyllosticta psidiicola*, Causing Fruit Rot on Guava in Venezuela. Plant Dis. 89:773

Kiely, T.B. 1949. Black spot of citrus in New South Wales coastal orchards. Agricultural Gazette of New South Wales 60: 17-20.

Kotzé, J., M., 2000. Black spot. Pages 23-25 in : Compendium of Citrus Diseases 2nd ed. L.W.Timmer, S. M. Garnsey, and J. H. Graham, eds. The American Phytopathological Society, St. Paul,MN.

Meyer, G. M., Sanders, R. Jacobs, and L. Korsten. 2006. A One-Day Sensitive Method to Detect and Distinguish Between the Citrus Black Spot Pathogen *Guignardia citricarpa* and *Guignardia mangiferae*. Plant Dis. 90:97-101.

Punithalingam, E and Holliday, P. 1975. *Guignardia musae*. No. 467 *In:* CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Sivanesan, A and P. Holliday. 1981. *Guignardia bidwelli*. No. 710 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, U.K.

Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 *In*: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institue. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.

Van der Aa HA. 1973. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology 5, 110pp.

การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *catleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วงศ์ บุญสืบสกุล ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp.*cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้ พบระบาดในกล้วยไม้สกุลการ้าหลายชนิด ได้แก่ สกุลแวนดา สกุลแอสโคเซนดา ลูกผสมแวนดา สกุลช้าง สกุลฟาแลนอปซิส อาการแผลจุดเริ่มแรกเป็นสีเขียวถึงเหลืองอ่อน ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นสีน้ำตาลถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นแอ่งบุ๋มตรงกลาง มีวงสีเหลืองล้อมรอบ การทดสอบเทคนิคพีซีอาร์เพื่อการตรวจเชื้อ โดยทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ RST49 (5' GATGGCCGTGCCCTTCTTCATC CTCG3') /RST51 (5' CATGGCCACGATGAGGATCG 3') (Minsavage, 1995) ต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไอโซเลท 206 พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจาง ๆ แต่ไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากไอโซเลท PA370 และพบแถบดีเอ็นเอจาง ๆ จากเชื้อ *B. gladioli* ไม่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *E. caotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ที่เป็นสาเหตุโรคในกล้วยไม้ได้เช่นเดียวกับผลการทดสอบสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ WFB1 5'-GACCAGCCACACTGGGAC-3' และ WFB2 5'-CTGCCGTACTCCAGCGAT-3' (Walcott et al. 2000) และ AacF2/AacR3 (Schaad, personal contact) ในการศึกษาต่อไปจะทดสอบปรับสภาพที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ และ วิเคราะห์ลำดับเบส บริเวณ 16s rDNA เพื่อพัฒนาเทคนิคเพื่อการตรวจเชื้อต่อไป

รหัสการทดลอง 09 01 49 02

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย ทั้งการส่งออกไม้ตัดดอก มาลัยกล้วยไม้ หรือต้นกล้วยไม้ลูกผสมต่าง ๆ ซึ่งโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรียของกล้วยไม้ มีรายงานพบแบคทีเรีย 3 ชนิดที่เป็นสาเหตุโรคในกล้วยไม้ ซึ่งปัจจุบันเริ่มเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิต และการส่งออก นอกจากนี้ยังมีการนำเข้าพันธุ์กล้วยไม้ชนิดใหม่ ๆ ทำให้มีความเสี่ยงสูงในการติดมาของเชื้อสาเหตุโรคสายพันธุ์ใหม่ เนื่องจากนโยบายเปิดการค้าเสรีในปัจจุบัน การนำเข้าพืชในกลุ่มนี้ยังมีสถานะเป็นสิ่งไม่ต้องห้าม จึงมีความเสี่ยงต่อการแพร่ระบาดของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ๆ ทำความเสียหายกับธุรกิจการส่งออกกล้วยไม้ และไม้ดอกไม้ประดับอื่น ทั้งนี้ในประเทศไทยยังไม่มีฐานข้อมูลที่สมบูรณ์ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ สำหรับการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช และการวางแผนการควบคุมศัตรูพืช รวมถึงข้อมูลเชื้อเพื่อการคัดพันธุ์ต้านทานโรค การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์เพื่อการตรวจเชื้อและจำแนกแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ จะช่วยให้สามารถตรวจวินิจฉัยโรค และสาเหตุของการเกิดโรคได้รวดเร็ว เพื่อการป้องกันกำจัด หรือการตรวจเชื้อนำเข้าหรือส่งออก

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ

เก็บตัวอย่างโรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ทำการแยกเชื้อจากส่วนที่เป็นโรค โดยตัดเนื้อเยื่อพืชส่วนที่เกิดโรคเป็นชิ้นเล็ก ๆ ล้างด้วยน้ำกรองฆ่าเชื้อ 1-2 ครั้ง จากนั้นหยดน้ำกรองฆ่าเชื้อบนชิ้นส่วนพืช บดด้วยแท่งแก้วลนไฟฆ่าเชื้อ จนเซลล์พืชแตก ทิ้งไว้ 3-5 นาที ใช้ลูปลนไฟฆ่าเชื้อแตะไปลากบนอาหาร Nutrient Glucose Agar (NGAบ่มจานเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีมีลักษณะโคโลนีกลมสีขาวใส ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร นำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร NGA ทดสอบคุณสมบัติการก่อให้เกิดโรค แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทในหลอดอาหารเอียง น้ำนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการศึกษาระยะสั้น และเก็บในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการศึกษาระยะยาว

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว Nutrient broth บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ไปเปตดูดเชื้อ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ใน tube ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูด supernatant (ส่วนใส) ที่อยู่ด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์แบคทีเรีย นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด Genomic DNA Purification Kit #K0512 (Fermentous Life Science) ตามขั้นตอน ดังนี้ ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ด้วยน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร

200 มิลลิลิตร นำผสมให้เข้ากันด้วย vortex เติม Lysis solution 400 มิลลิลิตร เติม Chloroform 600 มิลลิลิตร (ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดไปมา) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เก็บ supernatant ใส่หลอดใหม่ เติม Precipitation 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูด supernatant ทิ้ง เติม NaCl Solution 100 มิลลิลิตร (ละลายตะกอนให้เข้ากันดี) เติม Cold ethanol 300 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เก็บตะกอนดีเอ็นเอ เติม 70% ethanol 300 มิลลิลิตร เพื่อล้างดีเอ็นเอ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย TE buffer (10 mM Tris- HCL, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 µl เก็บไว้ที่ - 20°C จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอบนอะกาโรส 0.8% ด้วยวิธี eletophoresis เก็บสารละลายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. **ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ** *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์จากบริษัท QIAGEN Operon (QIAGEN, Cologne, Germany) และได้รับการอนุเคราะห์ไพรเมอร์ AacR2/ AacF3 จาก Dr.Norman Schaad ดังนี้

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ขนาด (bp)	อ้างอิง
RST49	5'-GATGGCCGTGCCCTTCTTCATCCTCG-3'	390	Minsavage et al. 1995
RST51	5'-CATGGCCACGATGAGGATCG-3'		
WFB1	5'-GACCAGCCACACTGGGAC-3'		Walcott et al. 2000
WFB2	5'-CTGCCGTACTCCAGCGAT-3'		

เตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

สารประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10 X บัฟเฟอร์	2.5	1 X
$MgCl_2$	1.5	1.5 mM
dNTPs 2.5 mM	2	0.2 mM
ไพรเมอร์ ชนิดที่1 25 pM	1	25 pM
ไพรเมอร์ ชนิดที่ 2 25 pM	1	25 pM
Taq DNA polymerase 5 U/ ul	0.25	1.25 U
ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม	1	50 ng
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	15.75	-

สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ PE 2400 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA) โดยใช้อุณหภูมิและเวลา ในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยคู่ไพรเมอร์		
	RST49/RST50	WFB1/WFB2	AacF2/AacR3
1.เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (initial denaturation)	94°C 2 นาที	94°C 2 นาที	94°C 2 นาที
2.แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturation)	94 °C 30 วินาที	94 °C 15 วินาที	94 °C 15 วินาที
3.ไพรเมอร์จับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing)	53 °C 1 นาที	55 °C 40 วินาที	60 °C 40 วินาที
4.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension)	72 °C 1 นาที	72 °C 1 นาที	72 °C 1 นาที
5.สังเคราะห์สายดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension)	72 °C 7 นาที	72 °C 7 นาที	72 °C 7 นาที

ทุกคู่ไพรเมอร์ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 35 รอบ และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ขนาดของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (Promega,Madison, WI) 1 ไมโครลิตร และ Gel star (สีที่ติดฉลากแถบดีเอ็นเอ) แยกขนาดของสายดีเอ็นเอ ด้วยอะกาโรส เจลเจลอิเลค

โตรโฟริซิส ใช้ 2% อะกาโรส เจล ใน 0.5X TBE บัฟเฟอร์ ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักดิ์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วย Dark reader

ระยะเวลาดำเนินการ 1ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 – กันยายน 2552

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อ

ลักษณะอาการการเกิดโรคในระยะเริ่มแรก พบแผลจุดเล็กสีครีมอมเหลืองหรือแผลจุดสีเขียวอ่อน กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่ยุบตัวเป็นแอ่ง ขอบแผลสีเข้ม และวงนอกสุดล้อมรอบด้วย halo สีเหลืองหรือเขียวอ่อน ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยมากพบบริเวณใบยอด หรือใบอ่อน ต่อมาอาการพัฒนา มีลักษณะแผลค่อนข้างกลม กลางแผลสีน้ำตาลอ่อนหรือเข้ม ขอบแผลเป็นวงสีน้ำตาลเข้ม กลางแผลมีลักษณะเนื้อเยื่อที่แห้งยุบตัวเป็นแอ่ง ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง ขนาดแผลเฉลี่ย 3-5 มิลลิเมตร

จากการแยกเชื้อบนอาหาร NGA แบคทีเรียเจริญหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 36-48 ชั่วโมง มีลักษณะโคโลนีกลมสีขาวใส ขอบเรียบ ขนาดประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร เมื่อเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้เป็นเวลานานกว่า 5-7 วัน จะพบบริเวณขอบของโคโลนีมีคราบสีขาวใสขอบไม่เรียบบาง ๆ รอบโคโลนี

เก็บเชื้อลงในน้ำ บนอาหารเอียงเททับด้วยพาราฟิน เพื่อใช้ในการทดลอง

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ จำนวน 16 ไอโซเลท ประกอบด้วย แบคทีเรีย *A. avanae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดกล้วยไม้ แบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่า แบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* (ตารางที่ 1)

3. ทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ในการตรวจเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยคู่ไพรเมอร์ RST49 และ RST50 สามารถสังเคราะห์เพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 390 bp จากดีเอ็นเอแม่แบบของเชื้อ *A. avenae* subsp. *citrulli* ไอโซเลท PA 212 และพบแถบดีเอ็นเอจาง ๆ ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ไอโซเลท PA 206 และ *Burkholderia gladioli* ไอโซเลท PA198 (ภาพที่ 3) ไม่พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากไอโซเลท PA370 และ PA377 และไม่พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *E.*

carotovora subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* คู่ไพรเมอร์ WFB1/WFB2 พบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย Aacat. ไอโซเลท PA206, PA370, PA377 และ Aac. ไอโซเลท PA212 แต่ไม่พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเชื้อชนิดอื่น เช่นเดียวกับไพรเมอร์ AacF2/AacR3 (ตารางที่ 2) ทั้งนี้ไพรเมอร์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด เป็นไพรเมอร์สำหรับแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *citrulli* สาเหตุโรคผลเน่าพืชตระกูลแตง จึงให้ผลการทดสอบที่ไม่ชัดเจนต่อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคกล้วยไม้ ทั้งนี้จะได้ทดสอบปรับสภาพของ อุณหภูมิ annealing ในการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอต่อไป

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp.*cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้ พบระบาดในกล้วยไม้สกุลการ้าหลายชนิด ได้แก่ สกุลแวนดา สกุลแอสโคเซนดา ลูกผสมแวนดา สกุลช้าง สกุลฟาแลนอปซิส อาการแผลจุดเริ่มแรกเป็นสีเขียวถึงเหลืองอ่อน ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้นเป็นสีน้ำตาลถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นแอ่งบุ๋มตรงกลาง มีวงสีเหลืองล้อมรอบ การทดสอบเทคนิคพีซีอาร์เพื่อการตรวจเชื้อ โดยทดสอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ RST49 (5’ GATGGCCGTGCCCTTCTTCATC CTCG3’) /RST51 (5’ CATGGCCACGATGAGGATCG 3’) (Minsavage, 1995) ต่อแบคทีเรียสาเหตุโรคใบจุดแบคทีเรีย ไอโซเลท 206, 370 พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจาง ๆ

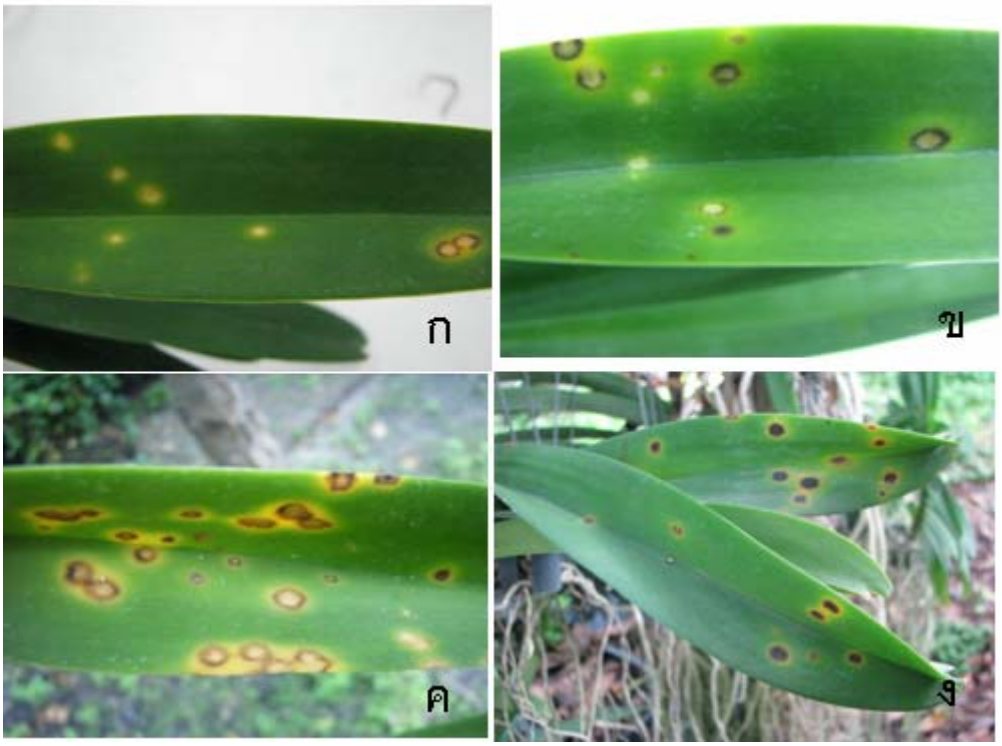
เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2552. การศึกษาโรคใบจุดแบคทีเรียของกล้วยไม้สกุล แวนดา. เรื่องเต็ม เอกสารประกอบการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 15-17 มีนาคม 2552. หมาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

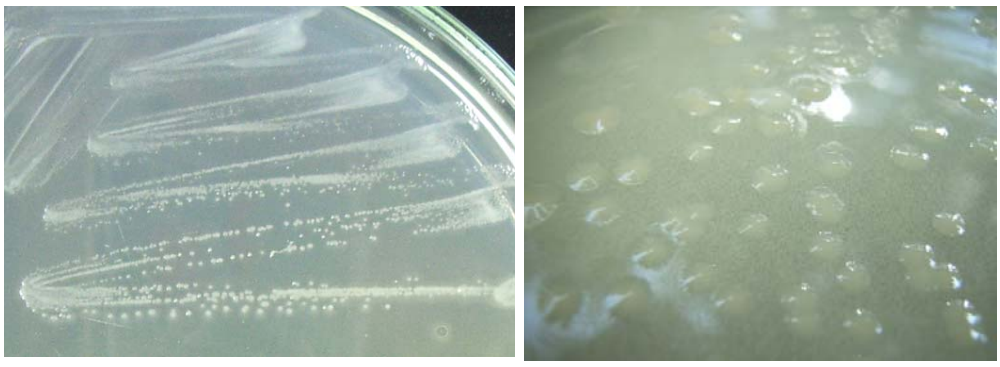
Miller, J. W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae*. Plant Pathology Circular no. 330.

Minsavage, G.V., R.J. Hoover, T. A. Kucharek, and R.E. Stall. 1995. Detection of the watermelon fruit blotch pathogen on seeds with the polymerase chain reaction. Phytopathology 85:1162 (Abstr.)

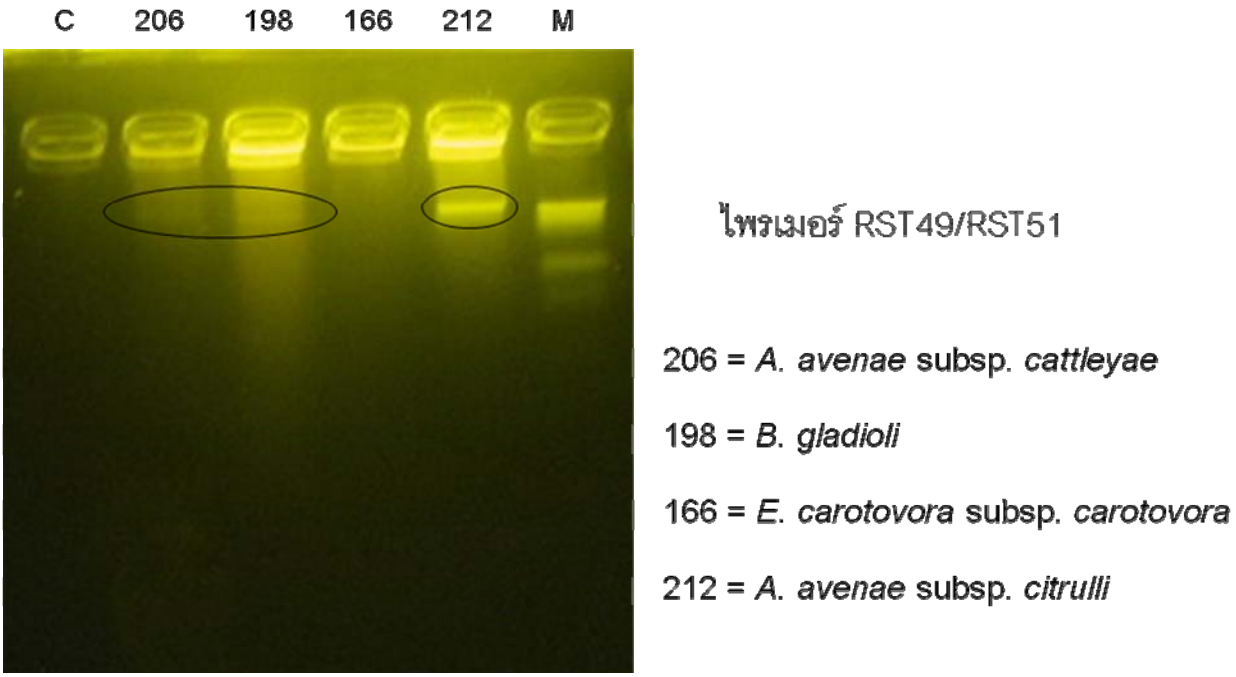
Stovold, G. E., J. Bradley and P.C. Fahy. 2001. *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (*Pseudomonas cattleyae*) causing leafspot and death of *Phalaenopsis* orchids in New South Wales. Australasian Plant Pathology. (30):73-74.



ภาพที่ 1 โรคใบจุดแบคทีเรียกล้วยไม้สกุลแวนดา



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* บนอาหาร NGA (ซ้าย) และบนอาหาร YDC (ขวา)



ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอจากการสังเคราะห์ ด้วยไพรเมอร์ RST49/RST51

ตารางที่ 1 ไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกล้วยไม้ และแหล่งที่มาของเชื้อ ที่ใช้ในการทดลอง

ไอโซเลท	พืชอาศัย	แหล่งปลูก	หมายเหตุ
206	แวนดา	อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	Aaca
356	ฟาแลนอปซิส	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	Aaca
357	กล้วยไม้ช้าง	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	Aaca
370	แวนดา	อ. สวนผึ้ง จ.ราชบุรี	Aaca
377	แคทลียา	อ. โพธาราม จ.ราชบุรี	Aaca
390	ช้างแดง	อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	Aaca
391	แวนดา	อ.โกรกพระ จ.นครสวรรค์	Aaca
393	ฟาแลนอปซิส	อ. โกรกพระ จ. นครสวรรค์	Aaca
212	เมลอน	อ.อรัญประเทศ จ.สระแก้ว	Aac.
166	ออนซิเดียม	เขตบางเขน กทม.	Ecc.
198	ช้างเขาแกะ	อ.สามพราน จ.นครปฐม	Bg.
248	แวนดา	อ. บ้านโป่ง จ. ราชบุรี	Ech.

ตารางที่ 2 ไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง และผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ RST49/RST51, WFB1/WRB2 และ AacF2/AacR3

เชื้อ/ ไอโซเลท	RST49/RST51	WFB1/WRB2	AacF2/AacR3
A. avenae subsp. *cattleyae* PA206	+	+	+
PA370	-	+	+
PA377	-	+	+
A. avenae subsp. *citrulli* PA212	++	++	++
E. carotovora subsp. *carotovora* PA166	-	-	-
E. chrysanthemi PA248	-	-	-
B. gladioli PA198	+	-	-

Nd = not determine ; + faint band, ++ strong band

การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว

Determination of Weedy Rice Contamination in Rice Seed Lots by Molecular Biology Technique

[1]จรรยา มณีโชติ [1]วันเพ็ญ ศรีทองชัย [2]ศันสนีย์ จำจด [3]กิ่งกาญจน์ พิชญกุล
[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่
[3]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การแพร่ระบาดของข้าววัชพืชโดยการปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ข้าวนั้น ได้ก่อให้เกิดปัญหารุนแรงในปัจจุบัน สาเหตุเนื่องจากข้าววัชพืชมีการปรับตัวและสามารถเลียนแบบลักษณะทางสัณฐานของข้าวปลูกที่ขึ้นร่วมกันได้ดี ทำให้การจำแนกด้วยสายตาไม่สามารถทำได้ การทดลองนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าวโดยใช้ความแตกต่างของ coleoptiles ร่วมกับเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs สุ่มเก็บตัวอย่างประชากรข้าววัชพืชชนิดข้าวดีด เปลือกเมล็ดสีฟาง ไม่มีหางที่ปลายเมล็ด เยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเหมือนข้าวปลูก แต่เมล็ดร่วงทั้งหมด จากแปลงที่มีการระบาดในแหล่งปลูกข้าวภาคกลาง ภาคเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวนทั้งหมด 20 ประชากร เบื้องต้นนำเมล็ดไปเพาะทดสอบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนเปรียบเทียบกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี1และชัยนาท1 หลังจากนั้นย้ายปลูกเพื่อเก็บตัวอย่างใบสำหรับวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เปรียบเทียบกับข้าวป่าสามัญ 1 ประชากรและข้าวปลูก 6 พันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี1 ชัยนาท1 ปทุมธานี1 พิษณุโลก2 ขาวดอกมะลิ 105 และ กข6 ผลการตรวจสอบการเจริญเติบโตของต้นอ่อนพบว่าข้าววัชพืชทุกประชากรมีความยาวต้นอ่อนเฉลี่ยมากกว่าข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 แต่มี 3 ประชากร (15%)ไม่แตกต่างจากข้าวปลูกพันธุ์ชัยนาท 1 ส่วนการตรวจสอบข้าววัชพืช 20 ประชากร จำนวน 386 ต้น โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs พบไพรเมอร์ 7 ตัว ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูกที่ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ ได้แก่ RM1 RM206 RM225 RM280 RM341 RM481 และ RM588 ความแม่นยำในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชนั้น ขึ้นอยู่กับจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ และเมื่อใช้ไพรเมอร์ร่วมกันทั้ง 7 ตัวสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชได้ทั้งหมดทุกต้น 100% สำหรับผลการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่าข้าววัชพืชมีพันธุกรรมของข้าวปลูกหลายๆ

รหัสการทดลอง 09-01-49-02-04-01-01-51

พันธุ์รวมอยู่ในต้นเดียวกันหรือมีพันธุกรรมข้าวป่าร่วมกับข้าวปลูก ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และปทุมธานี 1 โดยสรุปวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชชนิดที่มีลักษณะภายนอกเหมือนข้าวปลูกทุกประการได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

คำนำ

ประเทศไทยเป็นส่วนหนึ่งของความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวปลูก จึงมักพบข้าวที่เป็นเครือญาติ (relative races) ขึ้นอยู่ร่วมด้วย ประกอบด้วย ข้าวปลูก(*Oryza sativa* L.) ข้าววัชพืช *Oryza sativa f.* spontanea) และข้าวป่าสามัญ (*O. rufipogon* Griff.) ที่เป็นบรรพบุรุษ ข้าวทั้งสามชนิดมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากเนื่องจากมีจำนวนโครโมโซม 2n=24 และมีชุดจีโนมเป็นชนิด AA เหมือนกัน (Vaughan and Morishima, 2003) ทำให้ผสมข้ามกันและเกิดการปนเปื้อนยีนระหว่างกันได้ในสภาพธรรมชาติ (Oka, 1988) โดยปกติ การผสมข้ามเกิดขึ้นได้เป็นทิศทางเดียว คือจากเกสรตัวผู้ของข้าวปลูกที่เป็นพืชผสมตัวเอง ปลิวไปตกบนเกสรตัวเมียของข้าวป่าที่เป็นพืชผสมข้าม (Morishima *et al.,* 1980; Morishima, 1988; Song *et al.,* 2003) เกิดเป็นลูกผสมที่เป็น spontanea form หรือ ข้าววัชพืช (weedy rice)

ในปีพ.ศ. 2544 พบการระบาดรุนแรงของข้าววัชพืชชนิดข้าวหาง เป็นครั้งแรกของประเทศไทย ที่ตำบลเขาสามสิบหาบ อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี และสองปีต่อมาพบการระบาดของข้าววัชพืช ชนิดข้าวดีด ที่อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี พื้นที่การระบาดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลาเพียง 3 ปี โดยเริ่มจาก 5 หมื่นไร่ในปีพ.ศ. 2547 กลายเป็น 2 ล้านไร่ในปีพ.ศ. 2550 ปัจจุบัน พบระบาดทั่วไปในเขตภาคกลางจนถึงเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 26 จังหวัด (จรรยา,2547ก ; จรรยา,2547ข; จรรยา และศันสนีย์, 2548; จรรยา, 2552; Maneechote *et al.,* 2004) ข้าววัชพืชถูกจำแนกได้ 3 ชนิดตามความแตกต่างทางลักษณะภายนอก คือ ข้าวหาง ข้าวดีด และข้าวแดง ชนิดที่เป็นปัญหาร้ายแรงคือ ข้าวหางและข้าวดีด เพราะเจริญเติบโตได้รวดเร็วในระยะแรก และสูงข่มข้าวปลูกในระยะแตกกอ ออกดอกก่อนข้าวปลูก แต่ชาวนาไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้เพราะเมล็ดร่วงหมด ทำให้ผลผลิตข้าวลดลงได้ตั้งแต่ 10-100% (จรรยา, 2552) และทำให้ชาวนาสูญเสียผลกำไรไร่ละ1,500-4,400 บาท (อริยา, 2547)

สาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของข้าววัชพืช คือ ปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์ข้าว เนื่องจากเกษตรกรทำนาปีละ 2-3 ครั้ง จึงไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้ในฤดูต่อไปได้ จำเป็นต้องซื้อเมล็ดพันธุ์ใหม่ทุกฤดู จึงมีโอกาสสูงที่จะได้เมล็ดพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนของข้าววัชพืช ใน

เบื้องต้น การตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชด้วยสายตานั้นทำได้โดยใช้ลักษณะภายนอกที่ต่างกัน เช่นความยาวเมล็ด สีเปลือกเมล็ด และ สีเยื่อหุ้มเมล็ด แต่วิธีนี้ เริ่มมีปัญหา เมื่อข้าววัชพืชเริ่มมีการปรับตัวจนลักษณะดังกล่าวเหมือนกับข้าวปลูก เช่นมีความยาวเมล็ดใกล้เคียงกับเมล็ดข้าวปลูก สีเปลือกเปลี่ยนจากสีน้ำตาลแดงเป็นสีฟาง และเยื่อหุ้มเมล็ดเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีขาวเหมือนข้าวปลูก

Wague (1992) ได้ทดลองเพาะเมล็ดข้าววัชพืช 2 ประชากรเปรียบเทียบกับข้าวปลูก 2 พันธุ์ พบว่าต้นอ่อนข้าววัชพืชทั้ง 2 ประชากรเจริญเติบโตได้ดีกว่าและมีความยาวของ coleoptiles มากกว่าข้าวปลูก จากการทำงานร่วมกับเกษตรกรในพื้นที่ระบาดของข้าววัชพืช ได้พบว่า ข้าววัชพืชมีการเจริญเติบโตของต้นอ่อนที่เร็วกว่าข้าวปลูก ถึงแม้ว่าเมล็ดข้าววัชพืชจะงอกมาจากใต้ดิน ในขณะที่ข้าวปลูกงอกอยู่บนผิวดิน (จรรยา, 2552) ดังนั้นความยาวของ coleoptiles ของต้นอ่อนข้าววัชพืชนั้น อาจเป็นลักษณะหนึ่งที่สามารถนำมาใช้จำแนกเมล็ดข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกได้

จรรยา และ คณะ (2549) รายงานว่า หลังจากเกษตรกรใช้วิธีการกำจัดข้าววัชพืชแบบผสมผสานอย่างต่อเนื่องมานาน 4 ฤดูปลูก จนกระทั่งไม่สามารถจำแนกการปนเปื้อนของเมล็ดข้าววัชพืชในพันธุ์ข้าวสุพรรณบุรี 1 ได้ด้วยสายตา จึงต้องใช้วิธีการตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RM1 จึงสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าวประมาณ 3% อย่างไรก็ตาม ข้าววัชพืชที่ระบาดอยู่ในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก จึงจำเป็นต้องมีการคัดเลือกหาวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำและครอบคลุมประชากรข้าววัชพืชได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้น การใช้วิธีการตรวจสอบหลายวิธีร่วมกัน น่าจะทำให้ประสิทธิภาพในการจำแนกการปนเปื้อนของข้าววัชพืช มีความแม่นยำและถูกต้องมากขึ้น

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ และแม่นยำ สำหรับใช้การจำแนกการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว

วิธีดำเนินการ

ในช่วงระหว่างเดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนมีนาคม 2551 ออกสำรวจแปลงนาเกษตรกรที่มีการระบาดของข้าววัชพืชในแหล่งปลูกข้าวภาคกลาง ภาคเหนือตอนล่าง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเลือกข้าววัชพืชชนิดข้าวดีด ซึ่งมีลักษณะภายนอกใกล้เคียงกับข้าวปลูกมากที่สุด คือมีทรงกอตั้งตรง จำนวนเมล็ดต่อรวงมาก การติดเมล็ดดี เปลือกเมล็ดสีฟางหรือน้ำตาลอ่อน ปลายเมล็ดไม่มีหาง แต่เมล็ดร่วงก่อนข้าวปลูก พร้อมทั้งบันทึกชื่อพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูกในแหล่งต่างๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพันธุ์ข้าวสำหรับใช้เป็นพันธุ์เปรียบเทียบ

อุปกรณ์

พันธุกรรมข้าวที่ใช้ในการทดลอง มี ดังนี้

1. ข้าววัชพืช สุ่มเก็บตัวอย่างข้าววัชพืช (weedy rice, *Oryza sativa* f spontanea)ชนิดข้าวดีดที่ระบาดในแหล่งปลูกข้าวในภาคเหนือตอนล่าง (จังหวัดพิษณุโลก และพิจิตร) ภาคตะวันออกเฉียง

เหนือ (จังหวัดกาฬสินธุ์ และอุบลราชธานี) และภาคกลาง (จังหวัดลพบุรี สระบุรี อยุธยา นครปฐม และปทุมธานี) จำนวน 20 ประชากร โดยทุกประชากรนั้น มีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวเหมือนข้าวปลูก แต่เมล็ดร่วงทั้งหมดเมื่อสุกแก่ (ตารางที่ 1)

2. ข้าวพันธุ์เปรียบเทียบ ใช้พันธุ์คัดของข้าวปลูก 6 พันธุ์ (*O. sativa* L.) จาก กรมการข้าวได้แก่ พันธุ์ สุพรรณบุรี 1 (SPR1) ชัยนาท 1 (CNT1) ปทุมธานี 1 (PTT1) พิษณุโลก 2 (PSL2) ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) และ กข 6 (RD6) และข้าวป่าสามัญ (*O. rufipogon* Griff.) จากจังหวัดปราจีนบุรี (PC) 1 ประชากรเป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ

วิธีการ

นำประชากรข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร มาทดสอบลักษณะเปรียบเทียบกับพันธุ์มาตรฐาน 7 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น 3 การทดลอง โดยการวัดการเจริญเติบโตของต้นอ่อน ลักษณะทางสัณฐานและการประเมินในระดับดีเอ็นเอ มีรายละเอียดดังนี้

การทดลองที่ 1 ความแตกต่างด้านการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

สุ่มเมล็ดข้าววัชพืชและข้าวปลูก ตัวอย่างละ 50 เมล็ด นำมาเพาะบนกระดาษกรองชุบน้ำใน Petri dishes 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกเมล็ดที่เริ่มงอกตัวอย่างละ 10 เมล็ด ย้ายปลูกในกล่องพลาสติกขนาด 17 x 25 x 10 ซม^3 บรรจุวุ้นที่มีความเข้มข้น 5 % w/v จำนวน 450 มิลลิลิตร ใน 1 กล่องวางตัวอย่างเมล็ดข้าวเป็นแถวได้จำนวน 15 ตัวอย่าง มีระยะห่างระหว่างแถว 1 ซม และระยะระหว่างเมล็ด 0.5 ซม แต่ละกล่องจะรวมข้าวปลูกพันธุ์เปรียบเทียบ (check genotypes) จำนวน 2 พันธุ์ คือพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR1) และชัยนาท 1 (CNT1) ปลูกทดสอบร่วมด้วย ดังนั้นแต่ละกล่องจะปลูกข้าววัชพืช 13 แถวและข้าวปลูก 2 แถว วางแผนการทดลองแบบ RCB โดยปลูกทดสอบ 3 ซ้ำในแต่ละประชากร หลังจากนั้น ใช้อะลูมิเนียมฟอลยด์หุ้มกล่องให้มิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้ต้นอ่อนได้รับแสง

หลังเพาะเมล็ดที่เริ่มงอก 5 วัน วัดความยาวของต้นอ่อน (จากเมล็ดถึงปลาย coleoptile) ทุกต้น และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) แบบ One-Way Classification เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวปลูกพันธุ์ตรวจสอบโดยใช้วิธี Least Significant Difference (LSD)

การทดลองที่ 2 ประเมินความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา

หลังจากวัดความยาวของต้นอ่อนของแต่ละประชากรในการทดลองที่ 1 แล้ว จึงย้ายต้นอ่อนจำนวน 20-30 ต้นต่อประชากร ปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดินขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว วางไว้ในเรือนทดลอง เมื่อข้าวมีอายุประมาณ 30 วัน จึงเก็บตัวอย่างใบของแต่ละต้น เพื่อนำไปวิเคราะห์ในระดับดีเอ็นเอในการทดลองที่ 3

เมื่อถึงระยะออกรวง บันทึกลักษณะทรงกอ สีตามส่วนต่างของใบและดอก รูปร่างลิ้นใบ ขนาดของเกสรตัวผู้และการมีหางที่ปลายเมล็ด ตามวิธีการของ สงกรานต์และคณะ, 2538 และ Chitrakorn (1995)

<u>การทดลองที่ 3</u> ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เก็บตัวอย่างใบแยกต้นๆ ละ 2-3 ใบ ประชากรละ 20-25 ต้น พับใส่ถุงกระดาษเก็บตัวอย่าง ทำให้ตัวอย่างใบข้าวแห้ง โดยนำถุงเก็บตัวอย่างที่บรรจุตัวอย่างใบข้าวใส่ในภาชนะปิดที่มี silica gel เป็นสารดูดความชื้น หลังจากแห้งแล้วเก็บตัวอย่างใบในถุงปิดผนึกและเก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (^{0}C) เพื่อใช้สำหรับขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

โดยบดตัวอย่างใบที่แห้งแล้วให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ก่อนนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (Panaud *et al*., 1996) โดยมีขั้นตอนดังนี้

<u>การสกัดดีเอ็นเอ</u>

นำตัวอย่างใบที่บดจนละเอียดแล้วบรรจุ eppendorf tube จากนั้นใส่ extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย deionized water, 4% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 20mM EDTA (pH 8), 1.4 M NaCl และ 0.4% β-mercaptoethanol จากนั้น จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาละลายด้วย TE buffer เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis 1.2% เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

<u>การทำปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)</u>

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR (Panaud *et al*., 1996) โดยใช้ microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats (SSRs) primers เติมสารผสมปริมาตร 20 ไมโครลิตร (µl) ต่อ 1 หลอด ซึ่งประกอบไปด้วย deionized water 16 µl, 10X buffer 2 µl, 50 mM$MgCl_2$ 1 µl, 25 mMdNTP 0.16 µl, primer 0.2 µl, 5 unit Taq DNA Polymerases 0.1 µl, DNA template 1 µl ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 2 มิลลิลิตร (ml) นำเข้าเครื่อง PCR

<u>การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR</u>

ในเบื้องต้น ได้ทำการคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล SSRs จำนวน 48 ตำแหน่ง ที่กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 โครโมโซม ซึ่งคาดว่าจะสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าสามัญได้ โดยใช้พันธุ์ข้าว 6 พันธุ์ คือ พันธุ์สุพรรณบุรี 1 (SPR1) ชัยนาท 1 (CNT1) ปทุมธานี 1 (PTT1) พิษณุโลก 2 (PSL2) ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105)กข 6 (RD6) และ และข้าวป่าสามัญ (PC) 1 ประชากร เป็นพันธุ์มาตรฐานเปรียบเทียบ หลังจากนั้นคัดเลือกเครื่องหมายโมเลกุล ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวป่าและข้าวปลูกได้จำนวน 7 ไพรเมอร์ (primer) แล้ว (ตารางที่ 1) จึงนำมาใช้วิเคราะห์ตัวอย่างข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวน repeat motif ค่า annealing temperature(°C) และตำแหน่งบนโครโมโซมของไพรเมอร์ 7 ตัว ที่ใช้ในการทดลอง

ไพรเมอร์	Repeat motif	Annealing temperature	ตำแหน่งบนโครโมโซม	ลำดับเบสของไพรเมอร์
RM1	(GA)26	55	1	F: GCGAAAACACAATGCAAAAA
				R: GCGTTGGTTGGACCTGAC
RM206	(CT)21	55	11	F: CCCATGCGTTTAACTATTCT
				R: CGTTCCATCGATCCGTATGG
RM225	(CT)18	55	6	F: TGCCCATATGGTCTGGATG
				R: GAAAGTGGATCAGGAAGGC
RM280	(GA)16	55	4	F: ACACGATCCACTTTGCGC
				R: TGTGTCTTGAGCAGCCAGG
RM341	(CTT)20	55	2	F: CAAGAAACCTCAATCCGAGC
				R: CTCCTCCCGATCCCAATC
RM481	(CAA)12	55	7	F: TAGCTAGCCGATTGAATGGC
				R: CTCCACCTCCTATGTTGTTG
RM588	(TGC)9	55	6	F: TTGCTCTGCCTCACTCTTG
				R: AACGAGCCAACGAAGCAG

F= Forward Primer R = Reverse Primer

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 10% polyacrylamide gel electrophoresis นำแผ่นเจลที่ได้ย้อมด้วยสาร Ethidium bromide เพื่อนำไปดูการเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีของเครื่อง UV transilluminator แล้วบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการตรวจนับแถบที่ปรากฏในน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) เดียวกัน ถ้าหากมีแถบให้คะแนนเป็น 1 และไม่มีแถบให้คะแนนเป็น 0 แล้วนำมาวิเคราะห์รวมโดยเพิ่มไพรเมอร์ครั้งละ 1ตัว เปรียบเทียบกับข้าวปลูกและข้าวป่าสามัญ จนครบทั้งหมด 7 ตัว วิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมของประชากรโดยใช้โปรแกรม STRUCTURE (Pritchard *et al.,* 2000) และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรโดยใช้ cluster analysis (Nei and Kumar, 2000)

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

ดำเนินการระหว่างเดือนตุลาคม 2550-กันยายน 2552 ที่เรือนทดลองกลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาพืชไร่ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> ความแตกต่างด้านการเจริญเติบโตของต้นอ่อน

เมื่อเพาะในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน ก่อนวัดความยาว coleoptile ของแต่ละประชากร พบว่าในระยะต้นอ่อน ประชากรข้าววัชพืชส่วนใหญ่ มีอัตราการเจริญเติบโตได้รวดเร็วกว่าข้าวพันธุ์ปลูก

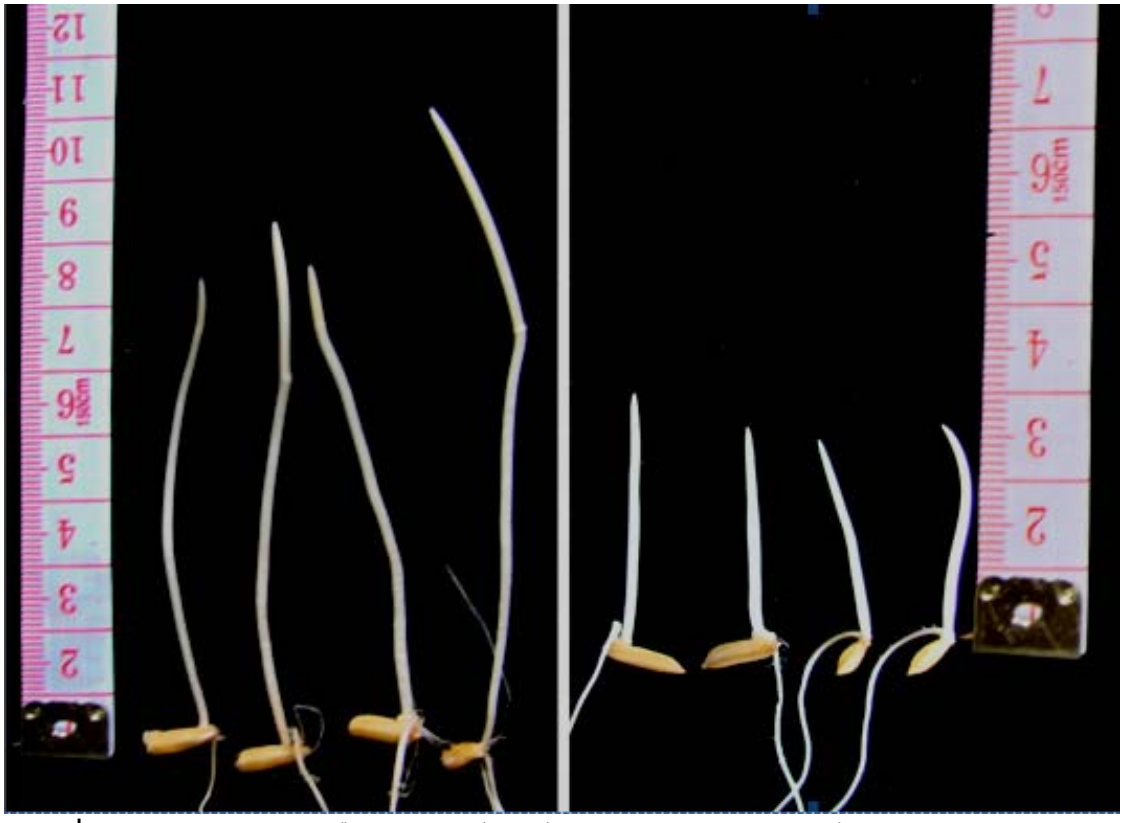
ตารางที่ 2 ความยาวต้นอ่อน (%) ของข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร หลังจากเพาะบนวุ้นในสภาพไม่มีแสงเป็นเวลานาน 5 วัน เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 และ ชัยนาท 1

ประชากร	แหล่งที่มา	ค่าเฉลี่ย (มม.)	ความยาวต้นอ่อน (%) เมื่อเปรียบเทียบกับ	
			สุพรรณบุรี1	ชัยนาท 1
1	พิษณุโลก	27.9	104 ns	135**
2	พิษณุโลก	27.1	101 ns	131**
3	พิษณุโลก	33.5	125**	161***
4	พิจิตร	32.2	121**	155***
5	พิจิตร	26.9	101 ns	130**
6	กาฬสินธุ์	36.6	137***	176***
7	กาฬสินธุ์	38.2	143***	184***
8	กาฬสินธุ์	34.7	130**	167***
9	กาฬสินธุ์	41.5	156***	200***
10	กาฬสินธุ์	35.7	134**	172***
11	กาฬสินธุ์	37.8	142***	182***
12	กาฬสินธุ์	33.4	125**	161***
13	กาฬสินธุ์	37.9	142***	183***
14	อุบลราชธานี	38.3	144***	185***
15	อุบลราชธานี	39.5	148***	190***
16	สระบุรี	31.9	120**	154***
17	สระบุรี	38.0	143***	183***
18	พระนครศรีอยุธยา	32.6	122**	157***
19	นครปฐม	33.9	127**	163***
20	ปทุมธานี	31.8	119**	153***
สุพรรณบุรี 1	กรมการข้าว	26.7	100	129***
ชัยนาท1	กรมการข้าว	20.7	78***	100

แตกต่างจากข้าวพันธุ์เปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ และ * แตกต่างจากข้าวพันธุ์เปรียบเทียบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบโดยใช้ วิธี Least Significant Difference

โดยที่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 และชัยนาท1 มีค่าเฉลี่ยของความยาว coleoptile เท่ากับ 26.7 และ 20.7 มม. ตามลำดับส่วนข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร มีความยาว coleoptile อยู่ระหว่าง 26.9-41.5 มม. (ตารางที่ 2)

เป็นที่น่าสังเกตว่าข้าววัชพืชทุกประชากรที่ตรวจสอบมี coleoptile ยาวกว่าสุพรรณบุรี1 (ภาพที่ 1) คิดเป็น 100% ที่ตรวจสอบได้ด้วยวิธีนี้ แต่ มี 3 ประชากรที่มีความยาว coleoptile ไม่แตกต่างจากพันธุ์ชัยนาท1 หรือคิดเป็น15% ที่ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตาม Hakizimana *et al.* (2000) พบว่าลักษณะความยาวของ coleoptile ในข้าวสาลีนั้น บางส่วนถูกควบคุมด้วยสภาพแวดล้อม และบางส่วนถูกควบคุมด้วยพันธุกรรมดังนั้น วิธีการวัดความแตกต่างในการเจริญเติบโตของต้นอ่อนนี้ สามารถใช้ตรวจสอบข้าววัชพืชได้ส่วนหนึ่ง จึงจำเป็นต้องใช้วิธีอื่นร่วมในการตรวจสอบให้ได้ทั้งหมด



ภาพที่ 1 ต้นอ่อนของข้าววัชพืช (ซ้าย) เปรียบเทียบกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (ขวา) หลังจากเพาะในที่มืด เป็นเวลานาน 5 วัน

<u>การทดลองที่ 2</u> ประเมินความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐาน

ข้าววัชพืชทุกประชากรที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐานไม่แตกต่างจากข้าวปลูกพันธุ์สมัยใหม่ที่นิยมปลูกกันทั่วไปในระบบนาหว่าน ในทุกตัวอย่างพบว่า ทุกต้นมีทรงกอตั้ง (ยกเว้นตัวอย่างที่ 3 และ 12 ที่พบบางต้นมีทรงกอแบบกึ่งแผ่) มีกาบใบ แผ่นใบและปล้องเป็นสีเขียว มีเขี้ยวใบและข้อต่อใบสีเขียวอ่อน ลิ้นใบสีขาวมี 2 แฉก สำหรับลักษณะดอกพบว่ามียอดดอกและเกสรตัวเมียสีขาว เกสรตัวผู้มีขนาดใหญ่ประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดดอก ทุกดอกไม่มีหางที่ปลาย (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ดังนั้นหากข้าววัชพืชชนิดนี้แพร่ระบาดลงไปในแปลงและมีความสูงใกล้เคียงกับข้าวปลูกเกษตรกรจะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากข้าวปลูกด้วยตาเปล่าได้เลย จะสังเกตุได้ก็ในระยะสุกแก่เท่านั้นเมื่อเมล็ดข้าววัชพืชร่วงออกจากรวงทั้งหมด (ศันสนีย์และคณะ, 2548; จรรยา,2552; Niruntrayakul, 2008)

<u>การทดลองที่ 3</u> ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าววัชพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจากการทดสอบเบื้องต้น เพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่าสามัญโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล 48 ตำแหน่ง ได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 7 ตัวได้แก่ RM1, RM 206, RM225, RM280, RM 341, RM481 และ RM588 ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวปลูกที่ใช้และระหว่างข้าวปลูกกับข้าวป่าสามัญ และเมื่อใช้ ตรวจสอบพันธุกรรมตัวอย่างข้าววัชพืช 20 ประชากร จำนวนทั้งหมด 386 ต้น (ตารางที่ 3)

ในการทดลองครั้งนี้ไพรเมอร์ RM1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการจำแนกความแตกต่างของการแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน (อัลลีล) โดยพบว่าเกิดความแตกต่างระหว่างพันธุ์ตรวจสอบทั้ง 7 ประชากร (ตารางที่ 4) รองลงมาได้แก่ไพรเมอร์ RM481 จำแนก 7 ประชากรได้เป็น 6 กลุ่ม RM586 จำแนกได้ 5 กลุ่ม และที่เหลืออีก 4 ตัวจำแนกได้ 3 ถึง 4 กลุ่ม เมื่อนำไพรเมอร์ทั้ง 7 ตัวมาตรวจสอบประชากรข้าววัชพืช (ภาพที่ 2-8) พบว่าข้าววัชพืชมีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งระหว่างประชากรและระหว่างต้นภายในประชากร ข้าววัชพืชทุกต้นแตกต่างจากข้าวปลูกตรงที่แต่ละต้นจะมีพันธุกรรมหลายชนิดปนกันอยู่ (admixture) ซึ่งเป็นผลจากการผสมข้ามระหว่างข้าววัชพืชกับข้าวปลูก (Niruntrayakul, 2008)

ความแม่นยำของการตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ (ตารางที่ 5)ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ไพรเมอร์ RM1เพียงตัวเดียวจะแยกต้นที่มีพันธุกรรมผสม (admixture)ได้เพียง75 ต้นจากทั้งหมด 386 ต้น คิดเป็น19.4% ที่เหลือ 311 ต้นมีพันธุกรรมเหมือนกับข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 จำนวน 70 ต้น (18.1%) มีพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์ชัยนาท1 จำนวน 35 ต้น (9.1%) มีพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์ปทุมธานี1 จำนวน 35 ต้น (9.1%) มีพันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 จำนวน49 ต้น (12.7%) พันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์ขาวดอก

มะลิ 105 จำนวน50 ต้น (13.0%) พันธุกรรมเหมือนข้าวพันธุ์กข6 จำนวน35 ต้น (9.1%) และ37 ต้น มีพันธุกรรมเหมือนข้าวป่าสามัญ คิดเป็น 9.6%ของจำนวนต้นทั้งหมด 386 ต้นของข้าววัชพืช ทั้งหมด 20 ประชากร เมื่อใช้ตรวจสอบร่วมกับไพรเมอร์ RM206 สามารถตรวจสอบพันธุกรรมข้าววัชพืชได้เพิ่มขึ้นเป็น 71.0% และเมื่อเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ เป็น 3 4 5 และ 6 ตัวจะแยกออกได้เพิ่มเป็น 90.2% 94.7% 98.5%และ 99.8% ตามลำดับ เมื่อใช้จำนวนไพรเมอร์ในการตรวจสอบร่วมกันทั้ง 7 ตัวพบว่าสามารถจำแนกข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกได้ทุกต้น คิดเป็น 100% (ตารางที่ 5) พยอมและคณะ (2551) รายงานว่า การจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ข้าวปทุมธานี 1 ในระดับดีเอ็นเอนั้น ต้องใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 13 ตัว แต่ถ้าต้องการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ105 และพันธุ์ข้าวชัยนาท1 แล้วต้องใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 23 ตัว

เมื่อศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมภายในประชากรข้าววัชพืชจากแต่ละภาค ภาคละ 2 ประชากร ได้แก่ข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง (8 = กาฬสินธุ์ และ 9 = อุบลราชธานี) จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (13= กาฬสินธุ์ และ 16 = อุบลราชธานี) และจากภาคกลาง (22 = ปทุมธานี และ26 =พระนครศรีอยุธยา) เปรียบเทียบกับพันธุ์ข้าวปลูก 6 ประชากร และข้าวป่าสามัญ 1 ประชากร วิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR marker 7 ตำแหน่ง ตามวิธีของ Pritchard *et al.* (2000) แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์โครงสร้างพันธุกรรมประชากรทั้งหมดร่วมกันโดยใช้ พบว่าสามารถจำแนกประชากรออกโดยอาศัยที่มาของบรรพบุรุษต่างกัน โดยแบ่งที่มาได้ 4 กลุ่ม แทนด้วยแต่ละสี ได้แก่

1) กลุ่มสีแดง ประกอบด้วยข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 1

2) กลุ่ม สีเหลือง ประกอบด้วยข้าวปลูกพันธุ์ปทุมธานี 1

3) กลุ่มสีน้ำเงิน ประกอบด้วยข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6

4) กลุ่มสีเขียว ได้แก่ ข้าวป่าสามัญ

ผลการวิเคราะห์พบว่าในข้าวปลูกพันธุ์แท้ทุกพันธุ์ ทุกต้นภายในประชากรจะมีโครงสร้างพันธุกรรมเหมือนกันหมด ในขณะที่โครงสร้างพันธุกรรมของข้าวป่าและข้าววัชพืชนั้นมีความแตกต่างระหว่างต้นภายในประชากร ในประชากรข้าววัชพืช พบความแตกต่างตั้งแต่ระดับภายในต้น ระหว่างต้นภายในประชากร ระหว่างประชากร และระหว่างท้องที่แต่ละภาค (ภาพที่ 9) ภายในต้นพบว่าพันธุกรรมของข้าววัชพืชเกิดจากการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่า (มีแถบสีเขียวปนร่วมกับสีอื่น) และข้าวปลูกกับข้าววัชพืช โดยพบจากข้าววัชพืชทุกประชากรที่ศึกษามีต้นที่มีพันธุกรรมของข้าวปลูกมากกว่าหนึ่งพันธุ์ร่วมกับข้าวป่าหรือบางต้นมีแถบสีของข้าวปลูกทั้ง 3 ชนิดร่วมกันแสดงให้เห็นถึงการผสมกลับไปหาข้าวปลูก ประชากรข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคเหนือตอนล่าง (หมายเลข

8 9 และ 22) ได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมส่วนใหญ่มาจากข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 หรือ ชัยนาท 1 หรือพิษณุโลก 1 (สีแดง) ส่วนประชากรข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มักตรวจพบพันธุกรรมของข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 หรือ กข 6 (สีน้ำเงิน) ปะปนอยู่มาก และพบพันธุกรรมชนิดข้าวปลูกปทุมธานี 1 ในตัวอย่างที่ 13 16 และ 26 เป็นที่น่าสังเกตว่าข้าววัชพืชจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางมีชนิดพันธุกรรมภายในแต่ละต้นเป็นจำนวนมากกว่าตัวอย่างข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง แสดงว่าข้าววัชพืชจากสองแห่งแรกเกิดมานานกว่าข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง จึงทำให้มีโอกาสผสมข้ามกับพันธุ์ต่างๆ ได้มากกว่า ซึ่ง Langevin *et al*. (1990) ได้รายงานว่า อัตราการผสมข้ามระหว่างข้าวปลูกและข้าววัชพืช มีค่าอยู่ระหว่าง 1 ถึง 52%

เมื่อนำประชากรทั้งหมดมาจัดกลุ่มโดยใช้ cluster analysis (Nei and Kumar, 2000) พบว่าข้าววัชพืชชนิดไม่มีหางนี้จะมีความใกล้ชิดกับข้าวปลูกมากกว่าข้าวป่า (PC) ข้าววัชพืชที่พบแต่ละท้องที่จะมีพันธุกรรมใกล้ชิดกับข้าวปลูกที่พบนิยมปลูกในท้องที่เหล่านั้น (ภาพที่ 10) จากการทดลองนี้พบว่าข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคกลาง (C1-C5) และภาคเหนือตอนล่าง (LN1-LN5 ยกเว้น LN4) จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดกาฬสินธุ์และอุบลราชธานีในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและ LN4 จากจังหวัดพิจิตรถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และปทุมธานี 1 ดังนั้นในการทดสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจะต้องพิจารณาถึงแหล่งที่แพร่ระบาด พันธุ์ข้าวที่นิยมปลูกควรนำมาร่วมเป็นพันธุ์ตรวจสอบด้วยจึงจะสามารถเข้าใจแหล่งที่มาของการเกิดข้าววัชพืชแต่ละชนิดได้ ซึ่งการศึกษาวิธีการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าว เพื่อให้ได้ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมและสามารถใช้เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่จะตรวจสอบได้ดี จำเป็นต้องมีดำเนินการวิจัยต่อไป

นอกจากนี้ การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเมล็ดข้าววัชพืชชนิดที่ไม่สามารถจำแนกได้ด้วยลักษณะสัณฐานภายนอก นั้น จะช่วยสนับสนุนการบังคับใช้กฎหมายตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 ที่แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติพันธุ์พืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2552 ประกาศสำหรับเมล็ดพันธุ์ควบคุม ข้าวเปลือกเจ้า กำหนดให้มีเมล็ดข้าวพันธุ์อื่นเจือปนได้ไม่เกิน 20 เมล็ดและมีเมล็ดข้าววัชพืชที่เป็นข้าวแดง เจือปนได้ไม่เกิน 10 เมล็ด ของน้ำหนักเมล็ดพันธุ์ข้าว 500 กรัม ตามที่กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าในปัจจุบันมีข้าววัชพืช ชนิดที่เมล็ดข้าวสารสีขาวเกิดขึ้นแล้วในแหล่งปลูกข้าวในภาคต่างๆของประเทศไทย หากไม่มีวิธีการตรวจสอบเพื่อควบคุมการเจือปนให้ได้ตามมาตรฐานที่กำหนดไว้ ข้าววัชพืชดังกล่าวสามารถสร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตข้าวทั้งด้านปริมาณและคุณภาพได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

- ความแตกต่างของความยาว coleoptile เมื่อเพาะเมล็ดในที่มืด พบว่า ข้าววัชพืชทั้ง 20 ประชากร มี coleoptile ยาวกว่าข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี1 แต่มี 3 ประชากรที่ไม่พบความแตกต่างจากข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 คิดเป็นประชากรที่ตรวจสอบไม่ได้ 15%
- ข้าววัชพืชทุกประชากรที่ศึกษามีลักษณะทางสัณฐาน ได้แก่ ลักษณะทรงกอ สีตามส่วนต่างของใบและดอก รูปร่างลิ้นใบ ขนาดของเกสรตัวผู้และการมีหางที่ปลายเมล็ดไม่แตกต่างจากข้าวปลูกพันธุ์สมัยใหม่ ต้องรอจนถึงระยะสุกแก่ จึงพบว่าเมล็ดร่วงทั้งหมด จึงเป็นวิธีที่ใช้เวลานานเกินไปที่จะใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืช
- พบไพรเมอร์ 7 ตัว ได้แก่ RM1 RM206 RM225 RM280 RM341 RM481 และ RM588 ที่สามารถแยกพันธุกรรมของข้าววัชพืชออกจากข้าวปลูกได้
- การตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลนั้นเป็นวิธีที่มีความแม่นยำมากที่สุด ประสิทธิภาพในการจำแนกข้าววัชพืชนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ หากต้องการตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชได้ทั้งหมด 386 ต้น หรือ 100% ต้องใช้ไพรเมอร์ร่วมกัน 7 ตัว
- ผลการวิเคราะห์โครงสร้างประชากรพบว่า ข้าวปลูกพันธุ์แท้ทุกพันธุ์ ทุกต้นภายในประชากรจะมีโครงสร้างพันธุกรรมเหมือนกันหมด ในขณะที่โครงสร้างพันธุกรรมของข้าวป่าและข้าววัชพืชนั้นมีความแตกต่างระหว่างต้นภายในประชากร
- เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้าววัชพืชและข้าวปลูกที่ใช้ตรวจสอบ พบว่าข้าววัชพืชจากภาคกลางและภาคเหนือตอนล่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับข้าวปลูกพันธุ์สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 และพิษณุโลก 2 ขณะที่ข้าววัชพืชที่เก็บตัวอย่างมาจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับข้าวปลูกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กข 6 และปทุมธานี 1
- การเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชนั้น ต้องพิจารณาถึงแหล่งที่ข้าววัชพืชแพร่ระบาด และควรเลือกพันธุ์ข้าวที่เกษตรกรนิยมปลูกมาใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำวิธีการนี้ไปใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของข้าววัชพืชในเมล็ดพันธุ์ข้าว 6 พันธุ์ ได้แก่ สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท 1 ปทุมธานี 1 พิษณุโลก 2 ขาวดอกมะลิ 105 และกข 6 ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และเป็นมาตรฐานเดียวกันในทุกห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อใช้เป็นวิธีป้องปรามการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ควบคุมข้าวเปลือกเจ้า ตามพระราชบัญญัติพันธุ์พืช พ.ศ. 2518 ซึ่งจะเป็นวิธีการที่สามารถช่วยลดปัญหาการระบาดของข้าววัชพืชที่เป็นอุปสรรคสำคัญ เพิ่มต้นทุนการผลิตให้เกษตรกร และลดปริมาณผลผลิตข้าวในภาพรวมของประเทศ
3. สามารถประยุกต์ใช้เป็นวิธีการประเมินความปลอดภัยทางชีวภาพ (biosafety) ของข้าวดัดแต่งสารพันธุกรรม (GMOs) โดยการตรวจสอบการปนเปื้อนยีนระหว่างข้าวปลูกและข้าววัชพืช และข้าวป่าได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

จรรยา มณีโชติ. 2547ก. ข้าววัชพืช:ภัยที่คุกคามของชาวนา. จดหมายข่าวผลิใบ กรมวิชาการเกษตร ปีที่ 7 ฉบับที่ 7 เดือน สิงหาคม 2547 หน้า 9-11.

จรรยา มณีโชติ. 2547ข. ข้าวหาง ข้าวแดง ข้าวดีด ภัยที่คุกคามของชาวนา. หนังสือพิมพ์กสิกร ปีที่ 77 ฉบับที่ 5 หน้า 6-15.

จรรยา มณีโชติ. 2552. ข้าววัชพืช ปัญหาและการจัดการ. กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 5โรงพิมพ์ฮั่วน้ำ พริ้นติ้ง จำกัด กรุงเทพฯ. 36 หน้า.

จรรยา มณีโชติ และ ศันสนีย์ จำจด. 2548. สถานการณ์การระบาดของข้าววัชพืชในประเทศไทย. หน้า 1-14. *ใน* : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าววัชพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 21 ตุลาคม 2548 ณโรงแรมรามาการ์เด้นท์ ถนนวิภาวดีรังสิต กรุงเทพฯ.

จรรยา มณีโชติ พนมวัน บุญช่วย อริยา เผ่าเครื่อง เบญจวรรณ ฤกษ์เกษม และศันสนีย์ จำจด. 2549. การจัดการข้าววัชพืชแบบผสมผสานในนาหว่านน้ำตมโดยเกษตรกรมีส่วนร่วม. วารสารอารักขาพืช 1: 1-12

พยอม โคเบลลี่ วราพงษ์ ชมาฤกษ์ พูนศักดิ์ เมฆวัฒนากาญจน์ พิกุล ลีลากุล กัลยา สานเสน. 2552. การพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารและการนำโมเลกุลเครื่องหมายมาใช้เพื่องานตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าว หน้า 83-103. วันที่ค้นข้อมูล 15 ธันวาคม 2552, จาก http://anchan.lib.ku.ac.th/astui/handle/10522/3306.

ศันสนีย์ จำจด จรรยา มณีโชติ และเบญจวรรณ ฤกษ์เกษม. 2548. บทบาทของการแลกเปลี่ยนยีนต่อการแพร่กระจายของข้าววัชพืช. หน้า 63-72. *ใน* : เอกสารประกอบการประชุมวิชาการข้าววัชพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการ อารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 21 ตุลาคม 2548 ณ โรงแรมรามาการ์เด้นท์ ถนนวิภาวดีรังสิต กรุงเทพฯ.

สงกรานต์ จิตรกร ฉวีวรรณ วุฒิญาโณ ผกาวรรณ ภู่สุวรรณ และ กัมปนาท มุขดี. 2538. การบันทึกลักษณะและวิเคราะห์ลักษณข้าวป่าในประเทศไทย. วารสารวิชาการเกษตร 3: 197-218.

อริยา เผ่าเครื่อง. 2547. การประเมินค่าการสูญเสียกำไรของเกษตรกร จากการรุกระบาดของข้าววัชพืชในจังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Chitrakorn S. 1995. Charactrization, evaluation and utilization of wild rice germplasm in Thailand. PhD Thesis, Hokkaido University, Japan.

Hakizimana, F., S. D. Haley and E. B. Turnipseed. 2000. Repeatability and genotype x environment interaction of coleoptile length measurements in winter wheat. *Crop Science* 40:1233-1237.

Maneechote, C., B.Rerkasem and S. Jamjod. 2004. Invasion of weedy rice in rice fields in Thailand: problems and management. *IRRN.* 29:20-22.

Morishima, H.,Y. Sano and H.I. Oka. 1980. Observation on wild and cultivar rice and companion weed in the hilly areas of Nepal, India and Thailand *In* : Report of Study-tour in tropical Asia, 1979. Rep. Natl. Ins. Genetics, Misima, 97 p.

Morishima, H. 1998. Genetic difference between wild and cultivated rice. *Agricultural Archaeology* 49: 30-35.

Nei, M. and S. Kumer. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. London.

Niruntrayakul, S. 2008. Gene Flow between Cultivated and Wild rice. PhD Thesis, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand.

Oka, H. I. 1988. Origin of cultivated rice. Japan Scientific Societies Press. Honorary Fellow, National Institute of Genetic, Misima, 411 Japan.

Panaud, O., X. Chen and S.R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 252: 597-607.

Pritchard J.K., M. Stphens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 943-959.

Song, Z.P., B.R. Lu, H.F. Zhou and J.K. Chen. 2003. Gene flow from cultivated rice to the wild species *Oryza rufipogon* experimental field condition. *New Phytologist* 157: 657 - 665.

Vaughan, D.A. and H. Morishima. 2003. Biosystematics of the genus *Oryza*. Pages 27-65. *In* : Rice Origin, History, Technology, and Production. C. W. Smith and R. H. Dilday. John Wiley &Sons, New Jersey.

Wague, K. 1992. Comparison of seedling vigor and competitiveness in selected red rices and cultivated rices. MSc Thesis, Mississippi Sate University, USA.

ตารางที่ 3 แหล่งที่มาของข้าววัชพืช 20 ประชากรและจำนวนต้นของแต่ละประชากรที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุล

ประชากรที่	แหล่งที่มาของข้าววัชพืช		จำนวนต้น
	ภาค	จังหวัด	
1	เหนือตอนล่าง	พิษณุโลก	18
2	เหนือตอนล่าง	พิษณุโลก	18
3	เหนือตอนล่าง	พิษณุโลก	15
4	เหนือตอนล่าง	พิจิตร	20
5	เหนือตอนล่าง	พิจิตร	19
6	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	20
7	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	23
8	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	18
9	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	17
10	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	19
11	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	20
12	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	22
13	ตะวันออกเฉียงเหนือ	กาฬสินธุ์	20
14	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อุบลราชธานี	18
15	ตะวันออกเฉียงเหนือ	อุบลราชธานี	20
16	กลาง	สระบุรี	20
17	กลาง	สระบุรี	20
18	กลาง	พระนครศรีอยุธยา	18
19	กลาง	นครปฐม	23
20	กลาง	ปทุมธานี	18
รวม			386

ตารางที่ 4 ชนิดของอัลลิล (allele) ที่ตรวจพบในข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่าสามัญ 1 ประชากร เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุล SSR markers 7 ตัว

พันธุ์ข้าว	ชนิดของอัลลิลที่ตรวจพบโดยใช้ เครื่องหมายโมเลกุล SSR markers						
	RM1	RM206	RM481	RM280	RM225	RM341	RM588
สุพรรณบุรี1	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
ชัยนาท1	BB	AA	BB	AA	BB	BB	BB
ปทุมธานี1	CC	BB	CC	AA	BB	AA	BB
พิษณุโลก2	DD	AA	BB	AA	CC	EE	CC
ขาวดอกมะลิ105	HH	BB	HH	BB	BB	CC	DD
กข6	GG	BB	GG	CC	BB	CC	BB
ข้าวป่าสามัญ	EE	EE	EE	DD	DD	DD	EE
Polymorphic group	7	3	6	4	4	4	5

ตารางที่ 5 ความถี่ของพันธุกรรม (Genotypic frequency, %) ของข้าววัชพืชแต่ละต้นที่จำแนกเป็นชนิดพันธุกรรมผสม (admixture) หรือชนิดข้าวปลูก (crop rice type) 6 พันธุ์ (SPR1, CNT1, PTT1, PSL2 , KDML105, RD6) และข้าวป่าสามัญ (wild rice) เมื่อตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR markers ตั้งแต่ 1-7 ตัว

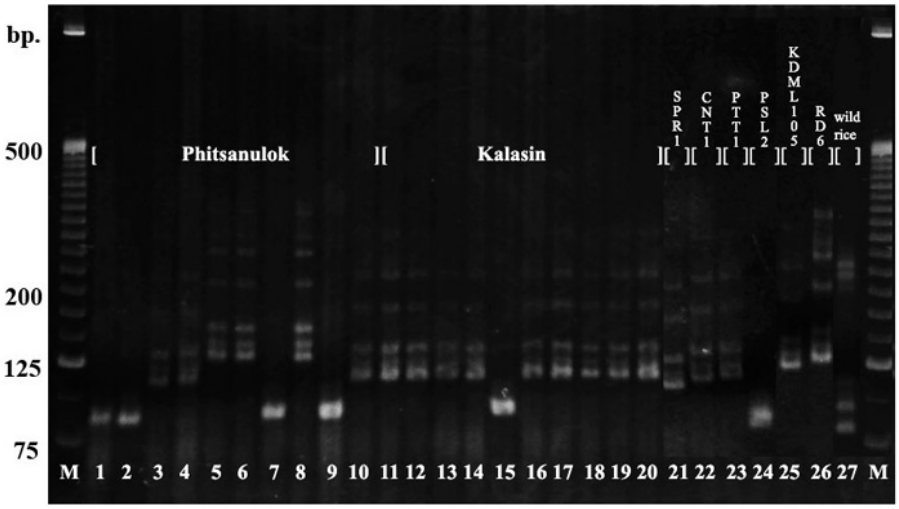
จำนวนไพรเมอร์	จำนวนต้นข้าววัชพืช	พันธุกรรมผสม (%)	พันธุกรรมชนิดข้าวปลูกและข้าวป่าสามัญ							รวม (%)
			SPR1	CNT1	PTT1	PSL2	KDML105	RD6	Wild rice	
1	386	*75*	70	35	35	49	50	35	37	*311*
		(19.4)	(18.1)	(9.1)	(9.1)	(12.7)	(13.0)	(9.1)	(9.6)	*(80.6)*
2	386	*274*	43	10	23	14	11	7	4	*112*
		(71.0)	(11.1)	(2.6)	(6.0)	(3.6)	(2.8)	(1.8)	(1.0)	*(29.0)*
3	386	*348*	23	5	4	3	2	1	0	*38*
		(90.2)	(6.0)	(1.3)	(1.0)	(0.8)	(0.5)	(0.3)	(0.0)	*(9.8)*
4	386	*365*	16	0	3	2	0	0	0	*21*
		(94.7)	(4)	(0)	(0.7)	(0.5)	(0)	(0)	(0)	*(5.3)*
5	386	*380*	6	0	0	0	0	0	0	*6*
		(98.5)	(1.5)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	*(1.5)*
6	386	*385*	1	0	0	0	0	0	0	*1*
		(99.8)	(0.2)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	*(0.2)*
7	386	*386*	0	0	0	0	0	0	0	*0*
		(100)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	*(0)*

1 primer: RM1; 2 primers: RM1 and RM206; 3 primers: RM1, RM206 and RM481; 4 primers: RM1, RM206, RM481 and RM280;

5 primers: RM1, RM206, RM481, RM280 and RM225; 6 primers: RM1, RM206, RM481, RM280, RM225 and RM341

7 primers: RM1, RM206, RM481, RM280, RM225, RM341 and RM588

1300



ภาพที่ 2 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยใช้ไพรเมอร์ RM1

SPR1 = ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด)

CNT1 = ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด)

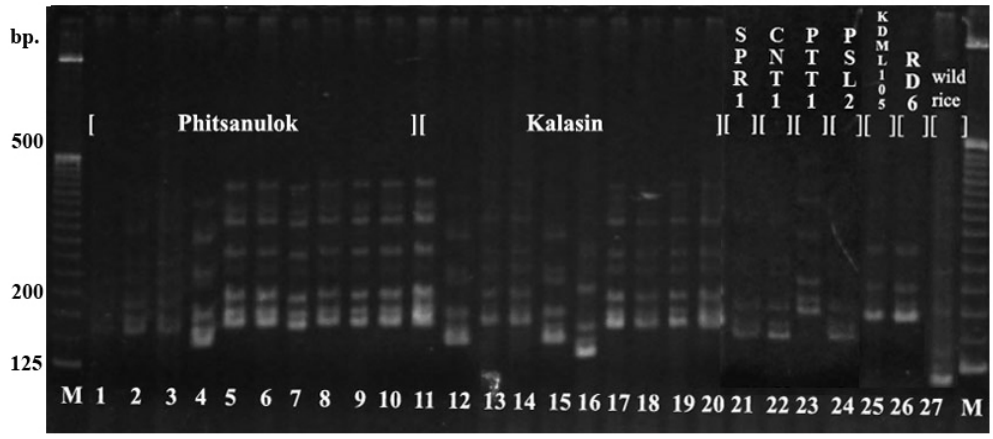
PTT1 = ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด)

PSL2 = ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด)

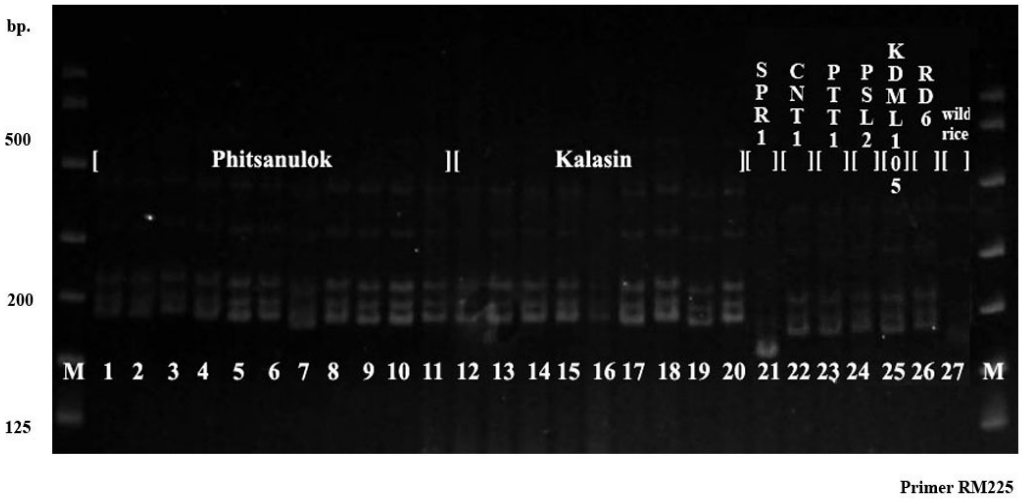
KDML105 = ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด)

RD6 = ข้าวพันธุ์กข 6 1 (พันธุ์คัด)

Wild rice = ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



ภาพที่ 3 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM206



ภาพที่ 4 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM225

SPR1 = ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด)

CNT1 = ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด)

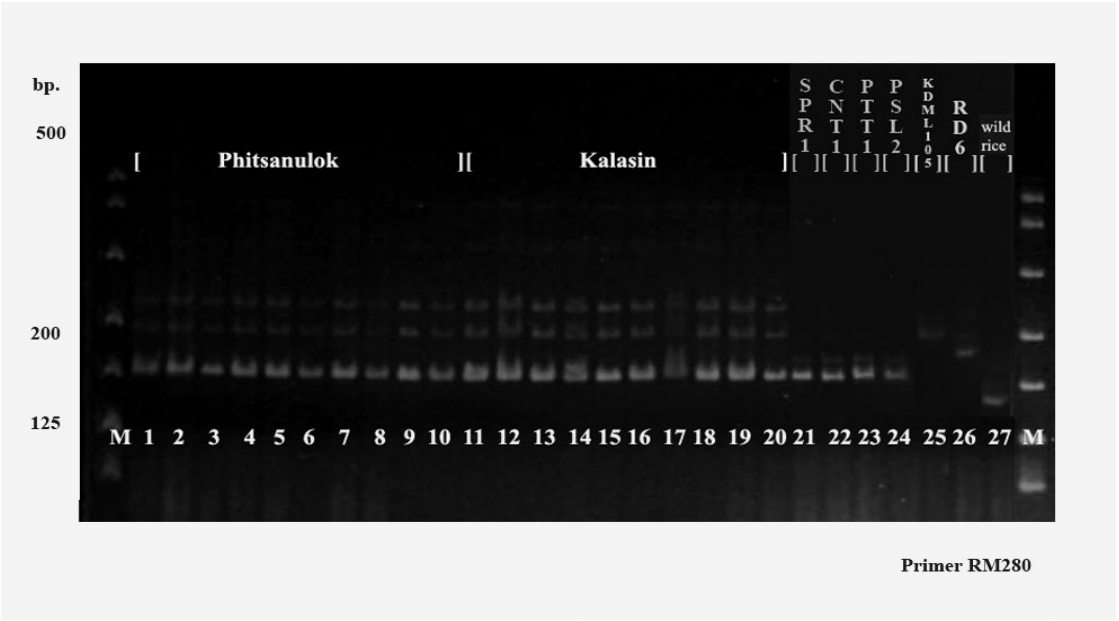
PTT1 = ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด)

PSL2 = ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด)

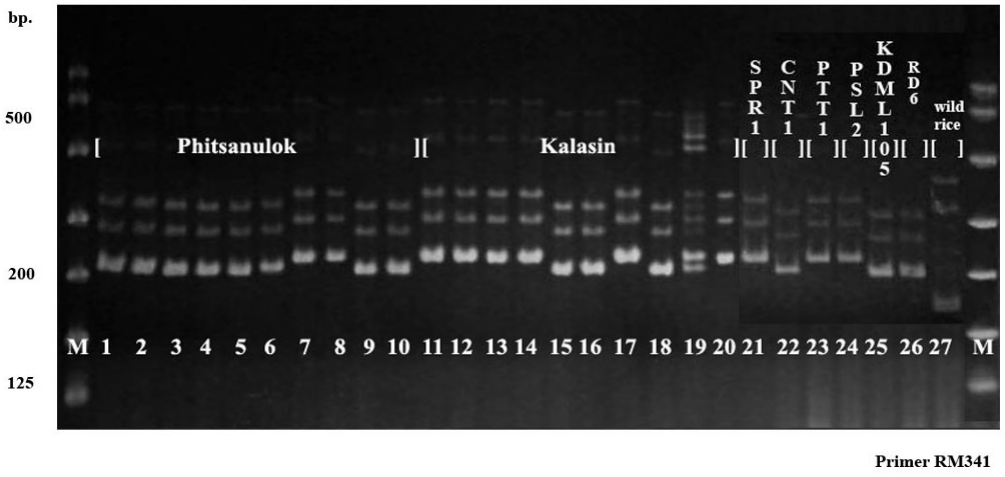
KDML105 = ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด)

RD6 = ข้าวพันธุ์กข 6 1 (พันธุ์คัด)

PC = ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



ภาพที่ 5 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM280



ภาพที่ 6 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM341

SPR1 = ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด)

CNT1 = ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด)

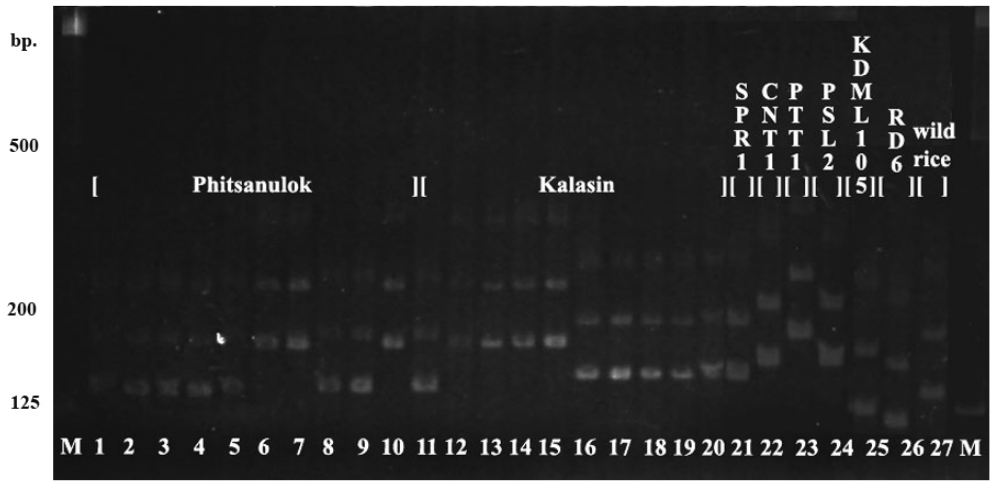
PTT1 = ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด)

PSL2 = ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด)

KDML105 = ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด)

RD6 = ข้าวพันธุ์กข 6 1 (พันธุ์คัด)

PC = ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



ภาพที่ 7 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM481

SPR1 = ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด)

CNT1 = ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด)

PTT1 = ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด)

PSL2 = ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด)

KDML105 = ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด)

RD6 = ข้าวพันธุ์กข 6 (พันธุ์คัด)

PC = ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี

ภาพที่ 8 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของข้าววัชพืช 2 ประชากรที่เก็บจากแปลงเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก (แถวที่ 1-10) และจังหวัดกาฬสินธุ์ (แถวที่ 11-20) เปรียบทียบกับกับข้าวปลูก 6 พันธุ์ และข้าวป่า 1 ประชากร (แถวที่ 21-27) โดยโดยใช้ไพรเมอร์ RM588

SPR1 = ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 1 (พันธุ์คัด)

CNT1 = ข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 (พันธุ์คัด)

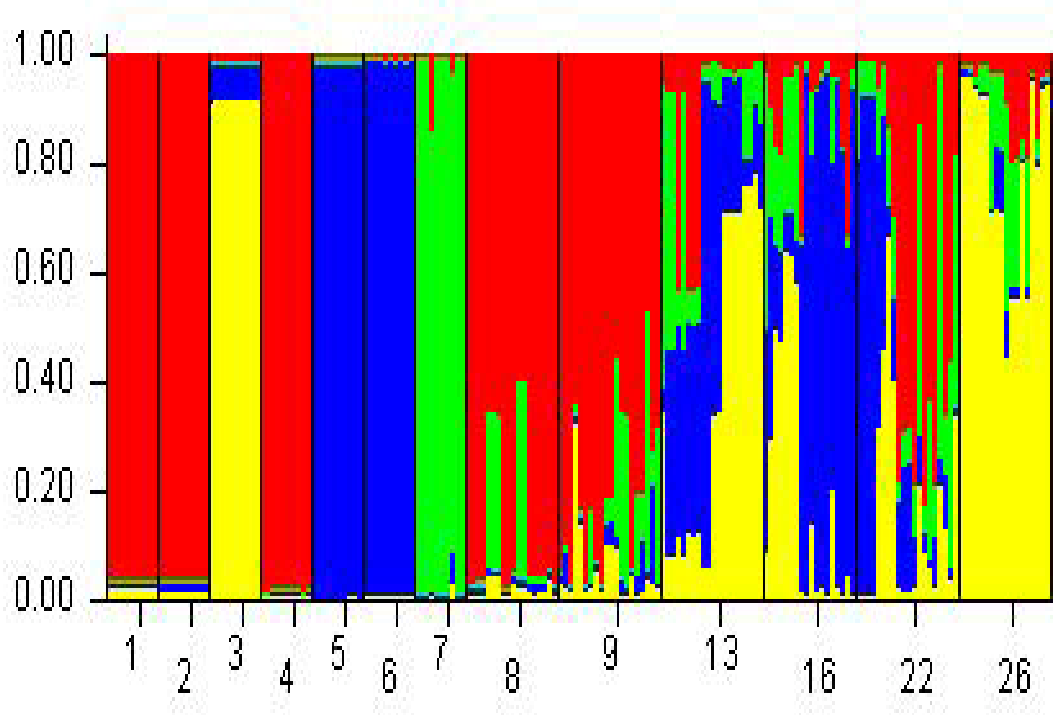
PTT1 = ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (พันธุ์คัด)

PSL2 = ข้าวพันธุ์พิษณุโลก 2 (พันธุ์คัด)

KDML105 = ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (พันธุ์คัด)

RD6 = ข้าวพันธุ์กข 6 (พันธุ์คัด)

Wild rice = ข้าวป่าสภาพธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี



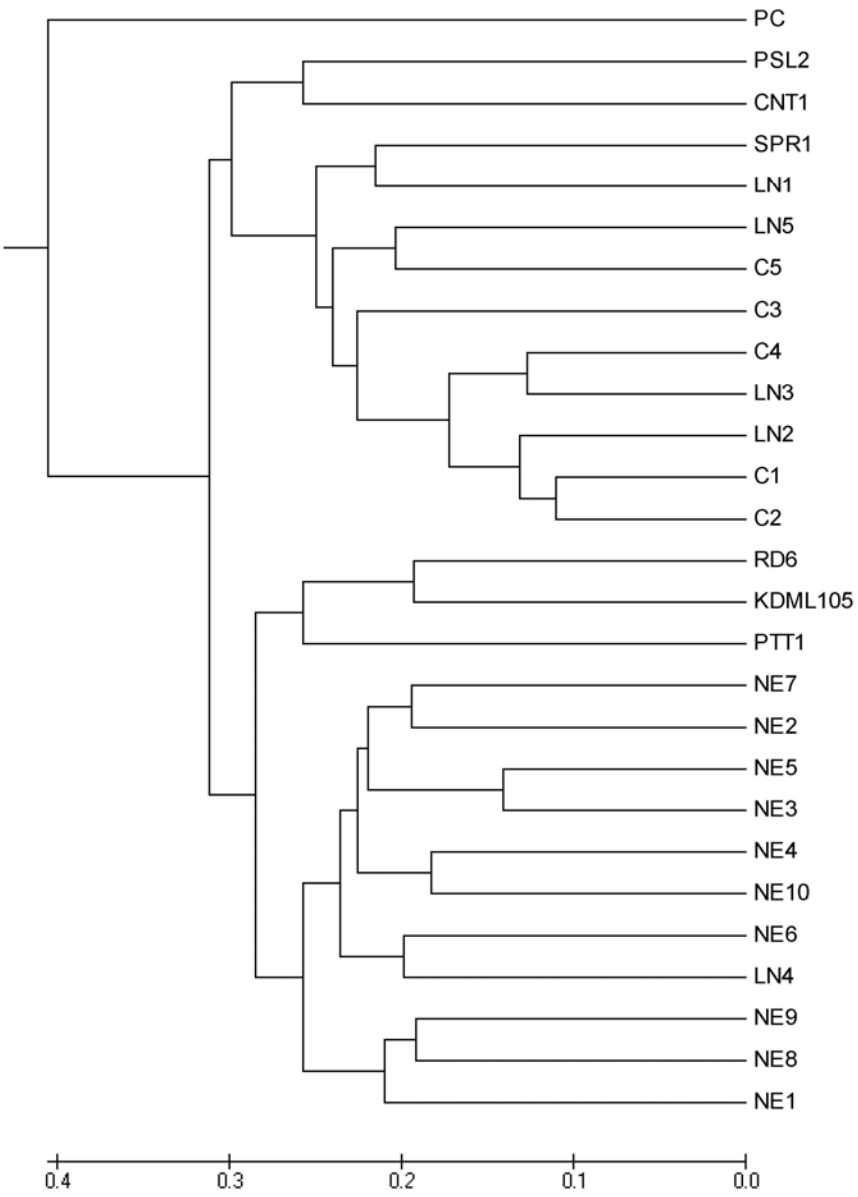
ภาพที่ 9 โครงสร้างประชากรข้าวปลูก 6 พันธุ์ (1-6) ข้าวป่า 1 ประชากร (7) และข้าววัชพืชจากภาคเหนือตอนล่าง (8 = กาฬสินธุ์ และ 9 = อุบลราชธานี) จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (13= กาฬสินธุ์ และ 16 = อุบลราชธานี) และจากภาคกลาง (22 = ปทุมธานี และ26 = พระนครศรีอยุธยา) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ร่วมกัน 7 ตัว แต่ละแท่งเป็นตัวแทนของแต่ละประชากรๆ ละ 10 ต้น

กลุ่มสีแดง ได้แก่ สุพรรณบุรี 1 ชัยนาท1 และพิษณุโลก 2

กลุ่มสีเหลือง ได้แก่ ปทุมธานี 1

กลุ่มสีน้ำเงิน ได้แก่ ขาวดอกมะลิ 105 และ กข 6

กลุ่มสีเขียว ได้แก่ ข้าวป่าสามัญ



ภาพที่ 10 แผนผังแสดงความสัมพันธ์ของข้าวปลูก 6 พันธุ์ (SPR1, CNT1, PTT1, PSL2, KDML105 และRD6) ข้าววัชพืช 20 ประชากรจากภาคเหนือตอนล่าง (LN1-LN5) ภาคกลาง (C1-C5) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NE1-NE10) และข้าวป่าสามัญจากปราจีนบุรี (PC) จากเครื่องหมายโมเลกุล 7 ตำแหน่งเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA โดยอาศัยค่า Nei's genetic distance

การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

Controlling Phytophthora Root Rot and Stem Rot of Durian by Antagonistic Microorganism

นลินี ศิวากรณ์ พจนา ตระกูลสุขรัตน์
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์รวม 8 ไอโซเลท ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน (*Phytophthora palmivora*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 8 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อราสาเหตุ *P. palmivora* และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบในปี 2551-2552 จำนวน 34 ไอโซเลท มาทดสอบด้วยวิธีการ baiting โดยเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 3 ครั้ง ลงไปในดินบ่มเชื้อ(infested soill) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถลดและกำจัดปริมาณ sporangium ในดินบ่มเชื้อโดยไม่พบ sporangium ในดินบ่มเชื้อเลย มีจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท 5607A,5807-1,5808-1 ,5809-1, 5907,5908,5923 และ 5932 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค 0% รองลงมา ได้แก่ 5805 และ 5806 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค 6.25% ในขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) มีเปอร์เซ็นต์เชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูง 92.50% และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในดิน จำนวน 8 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรคบนใบทุเรียน พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับทุเรียนมีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทำให้เกิดโรคบนใบทุเรียนโดยแสดงอาการวงสีเหลืองรอบบริเวณที่ทำแผลมีจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5607A,5807-1, 5907,5908,5923 และ 5932 ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยไม่ทำให้ทุเรียนแสดงอาการเกิดโรค ได้แก่ ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ซึ่งจากการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาจำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rDNA พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกัน คือ *Bacillus subtilis* strain CMG M8

รหัสโครงการ 07 01 49 02

คำนำ

ทุเรียน (Durian) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Durio zibethinus* Murr อยู่ในวงศ์ (Family) Bombacaceae เชื่อว่าทุเรียนมีถิ่นกำเนิดแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทุเรียนในประเทศไทยเข้าใจว่าคงนำพันธุ์มาจากมาเลเซียเข้ามาปลูกในสมัยกรุงศรีอยุธยาและในระยะแรกคือทุเรียนพันธุ์พื้นเมือง(มนัส.2545) ในปัจจุบันทุเรียนจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จนได้รับการยกย่องให้เป็น" ราชาแห่งผลไม้" (นายดำ,2535) พันธุ์ที่ชาวสวนนิยมปลูกมากที่สุดคือหมอนทอง 53.98 % ชะนี37.30 % ก้านยาว5.75% กระดุม2.97 % (นิรนาม, 2535) ในปี 2550 ไทยส่งออกทุเรียนปริมาณ 180,222 เมตริกตัน มูลค่า 3,480,014,000 บาท และในปี 2551ไทยส่งออกทุเรียนปริมาณ 222,560 เมตริกตัน มูลค่า 3,823,845,000 บาท โดยส่งออกเป็นทุเรียนสด แช่แข็ง กวนและอบแห้ง (นิรนาม,2551)

โรครากเน่าและโคนเน่าเป็นโรคที่มีมานานมากกว่า 30 ปีและสร้างความเสียหายตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบันมากกว่า 40,000 ไร่ (นิรนาม,2537) การป้องกันกำจัดมีหลายวิธี ถึงแม้จะใช้ต้นตอต้านทานโรคร่วมกับการใช้สารเคมี การระบาดของโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนก็ยังคงเกิดขึ้นอยู่เป็นประจำ ซึ่งการใช้สารเคมีสามารถควบคุมโรคได้ในระยะสั้นๆ เท่านั้น การควบคุมโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะนำมาใช้ควบคุมโรครากเน่าโคนเน่า ซึ่งในปัจจุบันมีการจำหน่ายเชื้อราไตรโคเดอร์มาช่วยลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่า แต่การระบาดของโรคก็ยังคงมีอยู่และยังเป็นปัญหาที่สำคัญต่อการปลูกทุเรียน ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์อื่น ๆ ที่เฉพาะเจาะจงซึ่งมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน เพื่อนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ให้เกษตรกรมีทางเลือกและวิธีการที่ดีในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน (*Phytophthora palmivora*)
2. ดินอบฆ่าเชื้อ , ข้าวโอ๊ต และถ้วยพลาสติก ขนาด 12X12 เซนติเมตร
3. ต้นทุเรียน กระถาง และดินปลูก
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA, PSA
5. กล้องจุลทรรศน์ และวัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการ

1. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียน บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าที่แยกได้บนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 วัน

1.2 เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในหลอดอาหาร PSA เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำมาใส่น้ำ 9 มล. และขูดเชื้อออกจากอาหาร แล้วนำมาปั่นให้เข้ากันด้วย vortex mixer

1.3 นำกระดาษทดสอบ (paper disc) ที่นึ่งฆ่าเชื้อมาวางที่ขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ 1.1 โดยวางให้ห่างจากขอบจานอาหารทั้ง 4 ด้านด้านละ 1.5 ซม.

1.4 ดูดสารละลายเชื้อในข้อ 1.2 ด้วย micro pipette จำนวน 1 ไมโครลิตร มาหยดบนกระดาษทดสอบที่วางบนจานอาหารแต่ละจุดในข้อ 1.3

1.5 ในกรรมวิธีเปรียบเทียบจะดูดน้ำนึ่งฆ่าเชื้อด้วย micro pipette จำนวน 1 ไมโครลิตร มาหยดบนกระดาษทดสอบที่วางบนจานอาหารแต่ละจุดในข้อ 1.3

1.6 นำจานอาหารในข้อ 1.4 และ 1.5 มาบ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยของเชื้อราสาเหตุในกรรมวิธีเปรียบเทียบเจริญเติบโตเต็มจานอาหาร

1.7 ทำการตรวจวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราสาเหตุ เส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ และบริเวณยับยั้ง

1.8 ตรวจวิเคราะห์ สรุปผลการทดลองโดยวัดขนาดและหาค่าเปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ปฏิกิริยาการยับยั้ง} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราในกรรมวิธีเปรียบเทียบ

B = ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราที่วางเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ชนิดเดียวกันทั้ง 4 ด้าน

2. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าด้วยวิธี Baiting

2.1 การเตรียมดินบ่มเชื้อ เตรียมอาหาร oat meal medium โดยการบรรจุข้าวโอ๊ต 5 กรัม/น้ำ 20 มล. ใส่จานเลี้ยงเชื้อ นึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนที่เลี้ยงบนอาหาร PDA มาเลี้ยงบนอาหาร oat meal medium ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องจนเส้นใยเจริญเติบโตเต็มจานเลี้ยงเชื้อใช้เวลาประมาณ 10 วัน จากนั้นนำมาปั่นในอัตราส่วน เชื้อรา 1 plate / น้ำ 200 มล. นำไปคลุกกับดิน 1 ก.ก. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธี

autoclave ที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 3 ครั้ง บ่มเชื้อในดิน 4 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

2.2 เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำไปผสมน้ำ 100 มล.

2.3 ชั่งดินบ่มเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 จำนวน 50 กรัม ใส่ในถ้วยพลาสติก ขนาด 12 X 12 ซม. แล้วเติมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2 ลงไป ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบให้เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มล. โดยไม่ใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ บ่มทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 วัน

2.4 เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 50 มล. ตัดใบส้มโอ ขนาด 1 X 1 ซม. ลงไปจำนวน 10 ใบ บ่มไว้ในอุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วนำใบมาตรวจหา Sporangium ของเชื้อรา *P. palmivora* ที่ติดอยู่ขอบใบทั้ง 4 ด้าน

2.5 การประเมินและตรวจให้คะแนนของ Sporangium ที่พบ ดังนี้

ระดับ 0 = ไม่พบ sporangium

ระดับ 1 = พบ sporangium 1 – 10 spore/ใบ

ระดับ 2 = พบ sporangium 11 – 20 spore/ใบ

ระดับ 3 = พบ sporangium 21 – 30 spore/ใบ

ระดับ 4 = พบ sporangium มากกว่า 30 spore/ใบ

2.6 นำมาคำนวณวิเคราะห์เปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค

เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค = $\frac{\text{ผลรวม(ระดับXจำนวนใบที่ baiting ในแต่ละระดับ)X100}}{\text{จำนวนใบที่ baiting ทั้งหมด X ระดับสูงสุด}}$

3. ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเกิดโรคกับใบทุเรียน

3.1 ตัดชำใบทุเรียนแล้วใช้สำลีพันก้านใบด้วยวิธี detached' s leaf จากนั้นนำมาวางในกล่องพลาสติกใสที่มีกระดาษฟางที่เปียกวางให้ความชื้น

3.2 นำ cork borer มาเจาะทำแผลบนใบทุเรียนโดยทำแผลระหว่างเส้นกลางใบทั้งสองข้างๆ ละ 2 จุด

3.3 นำเชื้อแบคทีเรียทีมีความสามารถในการลดปริมาณ sporangium ในข้อ 2 มาเลี้ยงบนจานอาหาร PSA เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้ cork borer เจาะแล้วนำไปวางบนใบทุเรียนที่ทำแผลเตรียมไว้ในข้อ 3.2 จุดละ 1 ชิ้น

3.4 ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบ นำอาหารที่ไม่ได้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาเจาะวางบนใบทุเรียนโดยทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2 และ 3.3

3.5 ตรวจผลการทำให้เกิดโรคบนแผลที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียและกรรมวิธีเปรียบเทียบ

4. จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ด้วยวิธี 16S rDNA โดยส่งเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปจำแนกที่ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2551 – กันยายน 2552
ห้องปฏิบัติงานกลุ่มเทคโนโลยีการจัดการโรคพืช สอพ. กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. **ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ** พบว่า จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์รวม 8 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จากส้มโอ จำนวน 7 ไอโซเลท และทุเรียน จำนวน 1 ไอโซเลท พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อราสาเหตุ *P. palmivora* ที่แยกได้จากแปลงปลูกส้มโอ ได้แก่ ไอโซเลท 5832, 5834 ,5831, 5828, 5835, 5803-6 และ 5802-6 ซึ่งให้ปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตโดยสร้างวงใสกว้างขนาด 10.0, 8.4,8.0,7.9,7.9,7.1 และ 6.3 มม. ตามลำดับ ส่วนที่แยกได้จากแปลงปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ ไอโซเลท 5937 สร้างวงใสกว้างขนาด 9.2 มม. (ตารางที่ 1)

2.ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกได้ต่อเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าด้วยวิธี baiting จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบในปี 2551-2552 จำนวน 34 ไอโซเลท มาทดสอบด้วยวิธีการ baiting พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถลดปริมาณ sporangium ของเชื้อรา *P. palmivora* ในดินบ่มเชื้อได้ โดยเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปครั้งที่ 1 ทำให้จำนวน sporangium ลดลงในทุกไอโซเลท และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถลดปริมาณ sporangium ในดินบ่มเชื้อได้มากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท 5908 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุด คือ 36.25% รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท 5907 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค คือ 37.50% และกรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) มีเปอร์เซ็นต์เชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูงเท่ากับ 100.00% และเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปครั้งที่ 2 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถลดปริมาณ sporangium ในดินบ่มเชื้อได้มากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท 5908 โดยมีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรคต่ำที่สุด คือ 12.50% รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท 5907 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค คือ 13.75% และรองลงมาอีกได้แก่ ไอโซเลท 5923 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค คือ 15.00 % และกรรมวิธีเปรียบเทียบ

(Control) มีเปอร์เซ็นต์เชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูงเท่ากับ 96.25% และเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปครั้งที่ 3 ซึ่งเป็นครั้งสุดท้าย พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถกำจัดปริมาณ sporangium ในดินบ่มเชื้อโดยไม่พบ sporangium ในดินบ่มเชื้อเลย มีจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5607A,5807-1,5808-1 ,5809-1, 5907,5908,5923 และ 5932 รองมา ได้แก่ ไอโซเลท 5805 และ 5806 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค คือ 6.25% ในขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) มีเปอร์เซ็นต์เชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูงเท่ากับ 92.50% (ตารางที่ 2)

3. **ทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อการเกิดโรคบนใบทุเรียน** เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคในดิน จำนวน 8 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรคบนใบทุเรียน พบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียง 2 ไอโซเลท ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับทุเรียน ได้แก่ ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทำให้เกิดโรคบนใบทุเรียนโดยแสดงอาการวงสีเหลืองรอบบริเวณที่ทำแผลมีจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5607A,5807-1, 5907,5908,5923 และ 5932

4. **จำแนกชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ด้วยวิธี** 16S rDNA พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันคือ *Bacillus subtilis* strain CMG M8

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์รวม 8 ไอโซเลท ต่อเชื้อสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน (*P. palmivora*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตต่อเชื้อราสาเหตุ *P. palmivora* ที่แยกได้จากแปลงปลูกส้มโอ ได้แก่ ไอโซเลท 5832, 5834 ,5831, 5828, 5835, 5803-6 และ 5802-6 ซึ่งให้ปฏิกิริยายับยั้งการเจริญเติบโตโดยสร้างวงใสกว้างขนาด 10.0, 8.4,8.0,7.9,7.9,7.1 และ 6.3 มม. ตามลำดับ ส่วนที่แยกได้จากแปลงปลูกทุเรียนในจังหวัดจันทบุรี ได้แก่ ไอโซเลท 5937 สร้างวงใสกว้างขนาด 9.2 มม. และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *P. palmivora* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดสอบในปี 2551-2552 จำนวน 34 ไอโซเลท มาทดสอบด้วยวิธีการ baiting พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สามารถลดปริมาณ sporangium ของเชื้อรา *P. parasitica* ในดินบ่มเชื้อได้ โดยเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปครั้งที่ 1 ทำให้จำนวน sporangium ลดลงในทุกไอโซเลท และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถลดปริมาณ sporangium ในดินบ่มเชื้อได้มากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท 5908 ทำให้เชื้อราสาเหตุโรคราก

เน่าโคนเน่าสามารถอยู่รอดในดินบ่มเชื้อได้น้อยที่สุด เท่ากับ 36.25% รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท 5907 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค เท่ากับ 37.50% และกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control)มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูงเท่ากับ 100.00% และเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปครั้งที่ 2 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 5908 ทำให้เชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าสามารถอยู่รอดในดินบ่มเชื้อได้น้อยที่สุด เท่ากับ 12.50% รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท 5907 และ 5923 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค เท่ากับ 13.75% 15.00 % ตามลำดับ และกรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) มีเปอร์เซ็นต์เชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูงเท่ากับ 96.25% และเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงไปครั้งที่ 3 ซึ่งเป็นครั้งสุดท้าย พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่สามารถกำจัดปริมาณ sporangium ในดินบ่มเชื้อโดยไม่พบ sporangium ในดินบ่มเชื้อเลย มีจำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท 5607A,5807-1,5808-1 ,5809-1, 5907,5908,5923 และ 5932 รองมา ได้แก่ ไอโซเลท 5805 และ 5806 มีเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเชื้อราสาเหตุโรค คือ 6.25% ในขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบ(Control) มีเปอร์เซ็นต์เชื้อราสาเหตุโรคในปริมาณสูงเท่ากับ 92.50% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใส่ลงในดินบ่มเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดโดยจะทำลายเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนได้จนหมดเมื่อใส่เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ลงในดินบ่มเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง และเมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนในดิน จำนวน 8 ไอโซเลท มาทดสอบการเกิดโรคบนใบทุเรียน พบว่า มีเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพียง 2 ไอโซเลท ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับทุเรียน ได้แก่ ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทำให้เกิดโรคบนใบทุเรียนโดยแสดงอาการวงสีเหลืองรอบบริเวณที่ทำแผลมีจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 5607A,5807-1,5907,5908,5923 และ 5932 ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งและกำจัดเชื้อราสาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยไม่มีผลต่อการทำให้ทุเรียนแสดงอาการเกิดโรค ได้แก่ ไอโซเลท 5808-1 และ 5809-1 ซึ่งจากการนำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท มาจำแนกชนิดด้วยวิธี 16S rDNA พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 2 ไอโซเลท ได้แก่ 58081- และ 5809-1เป็นเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันทั้ง 2 ไอโซเลท คือ *Bacillus subtilis* strain CMG M8

ตารางที่1 ปฏิกิริยาของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าและโคนเน่าของทุเรียนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ไอโซเลท	แหล่งปลูก/พืช	ปฏิกิริยาการยับยั้ง (%)	บริเวณวงใส (มม.)
5937	จันทบุรี/ทุเรียน	60.27	9.2
5802-6	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	54.34	6.3
5803-6	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	56.85	7.1
5828	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	59.13	7.9
5831	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	57.99	8.0
5832	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	59.36	10.0
5834	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	59.13	8.4
5835	สมุทรสงคราม/ส้มโอ	59.59	7.9

ตารางที่2 ศึกษาความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการลดปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคในดินบ่มเชื้อ(infested soil) ด้วยวิธี baiting

ไอโซเลท	ค่าความอยู่รอดของเชื้อสาเหตุ					
	ครั้งที่ 1	ลำดับที่	ครั้งที่ 2	ลำดับที่	ครั้งที่ 3	ลำดับที่
control	100.00o	24	96.25p	31	92.50k	19
61	100.00o	24	76.25o	30	36.25h	12
5607A	43.75a	3	17.50a	6	0.00a	1
5803	82.50j-m	18	53.75hij	18	20.00def	8
5804	75.00g-i	14	42.50de	12	8.75b	3
5805	70.00e-h	12	43.75def	13	6.25b	2
5806	76.25h-k	16	43.75def	13	6.25b	2
5807-1	55.00bc	6	26.25b	7	0.00a	1
5808-1	52.50b	4	15.00a	4	0.00a	1
5809-1	52.50b	5	16.25a	5	0.00a	1
5824	86.25lmn	8	60.00klm	23	21.25ef	9

5825	83.75k-m	19	57.50jk	21	36.25h	12
5826	82.50j-m	18	58.75jkl	22	13.75c	4
5828	83.75k-n	19	63.75lmn	25	36.25h	12
5831	66.25def	10	36.25c	8	15.00cd	5
5832	86.25lmn	20	43.75def	13	27.50g	11
5835	61.25cd	7	41.25cd	10	17.50cde	6
5903	78.75i-l	17	40.00cd	9	25.00fg	10
5904	75.00g-j	15	47.50efg	15	13.75c	4
5906	91.25n	23	55.00ijk	19	37.50h	14
5907	37.50a	2	13.75a	2	0.00a	1
5908	36.25a	1	12.50a	1	0.00a	1
5910	87.50mn	21	75.00o	29	62.50j	18
5912	66.25def	10	45.00d-g	14	17.50cde	6
5913	78.75i-l	17	58.75jkl	22	25.00fg	10
5919	90.00mn	22	60.00klm	24	40.00h	16
5920	82.50j-m	18	68.75n	28	51.25i	17
5922	86.25lmn	20	65.00mn	27	38.75h	15
5923	67.50d-g	11	15.00a	3	0.00a	1
5926	66.25def	10	56.25jk	20	37.50h	13
5927	65.00de	9	42.50de	11	17.50cde	7
5928	82.50j-m	18	65.00mn	26	51.25i	17
5932	67.50d-g	11	16.25a	5	0.00a	1
5934	73.75f-i	13	48.75fgh	16	17.50cde	7
5937	83.75k-n	19	50.00ghi	17	37.50h	14
cv	4.9%**		5.1%**		10.3%**	
mean	72.856		46.499		23.143	

เอกสารอ้างอิง

มนัส ดาเกลี้ยง. 2545. พันธุ์ทุเรียนเมืองลับแล. คณะ เกษตรศาสตร์และสิ่งแวดล้อม สถาบันราชภัฏอุตรดิตถ์. 17 หน้า

นายดำ ฉิ่งสุวรรณโรจน์. 2535. การผลิตผลไม้นอกฤดูกาลและการบำรุงรักษา.สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย.128 หน้า.

นิรนาม. 2535. การผลิตผลไม้นอกฤดูกาลและการบำรุงรักษา.สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย. 128 หน้า.

นิรนาม. 2537. ทุเรียน. หน้า 38-39 *ใน*:กลุ่มไม้ผล.รายงานประจำปี 2537 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

นิรนาม. 2551. การส่งออกสินค้าเกษตรไทย ตอนที่2. หน้า19. สถิติการค้าสินค้าเกษตรไทยกับต่างประเทศปี2551. ศูนย์สาระสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร.

การถ่ายทอดโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเพลี้ยแป้ง

Transmission of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* by mealybug

วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1] กาญจนา วาระวิชะนี[1] สุเทพ สหายา[2]

[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2] กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูจากแปลงที่ จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จำนวน 20 หน่อ โดยเทคนิค RT-PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-1 ได้แก่ Pa222-F1 (5′-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3′) และ Pa223-R (5′-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3′) จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-2 คือ Pa224-F2 (5′-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3′) และ Pa225-R2 (5′-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3′) ให้แถบ bandของดีเอ็นเอ ขนาด 609 คู่เบส พบว่า มี 12 หน่อที่ปลอดไวรัส จึงได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ยหน่อสับปะรดซึ่งเก็บไว้ในกรงกันแมลง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งปลอดไวรัสให้มีเพียงพอ และรอให้หน่อมีอายุที่เหมาะสำหรับใช้ในการถ่ายทอดไวรัสต่อไป

รหัสการทดลอง 01-08-49-01-02-01-03-52

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae มีถิ่นกำเนิดในประเทศบราซิลและปารากวัย เริ่มมีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยโดยชาวโปรตุเกสตั้งแต่ปี พ.ศ. 2223 และปลูกกระจายไปทั่วทุกภาคของประเทศ ตามความเหมาะสมของพื้นที่และชนิดพันธุ์ สับปะรดจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรด สับปะรดกวน สับปะรดแช่แข็งและสับปะรดอบแห้ง มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ 13,000-15,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน คือ “โรคเหี่ยว” ซึ่งพบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทย และคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง (Dilokkunanant *et al*., 1996) ด้วยเหตุที่เกษตรกรมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาด ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส PiWV (Pineapple wilt virus)ไปปลูก จึงทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดมายังภาคตะวันตก ในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ โดยพบการแพร่ระบาดของโรคสูงถึง 90% ของพื้นที่ในเขต ตำบลหนองพลับ อำเภอหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยว คือ พันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด จัดอยู่ในกลุ่มพันธุ์ Smooth Cayenne เป็นพันธุ์ที่นอกจากนิยมปลูกเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปแล้ว ยังเป็นพันธุ์หลักเพียงพันธุ์เดียวมาโดยตลอด นอกจากนี้ยังเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้บริโภคผลสดอีกด้วย (วันเพ็ญ, 2546)

โรคเหี่ยว เกิดจากไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายใน

เซลล์ท่ออาหารของพืช (Van Regenmortel, 2000; Sether *et al.,* 2001) โดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ โดยทั่วไปพบ *D. brevipes* ในแทบทุกแห่งที่มีการปลูกสับปะรด รวมทั้งประเทศไทย และมีมด ได้แก่ มดคันไฟ (*Solenopsis* sp.) และมดหัวโต (*Pheidole* sp.) เป็นตัวพาเพลี้ยแป้งให้กระจายจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่ง (ชำนาญ พิทักษ์ และคณะ, 2540; Beardsley, 1993) ทั้งยังมีวัชพืชชนิดต่างๆเป็นแหล่งหลบซ่อนของมดและเพลี้ยแป้ง ลักษณะอาการของโรคที่เด่นชัด คือใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ และโรคนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical inoculation) (German *et al.* , 1992; สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2546)

ปัจจัยสำคัญในการแพร่ระบาดของโรคเหี่ยวในแปลงปลูกคือ เพลี้ยแป้ง ซึ่งในประเทศไทยพบว่า มีเพลี้ยแป้งสีชมพูในแปลงปลูกสับปะรด ฉะนั้นจึงเห็นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้ง เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลในการป้องกันกำจัดโรคนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว
2. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
3. เพลี้ยแป้งสีชมพู
4. โรงเรือนทดลอง และกรงกันแมลง
5. ดินและกระถางสำหรับปลูกสับปะรด
6. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา

วิธีการ

1. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรดใน จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดบนผลฟักทองในกล่องกันแมลง โดยย้ายเพลี้ยแป้งไปบนฟักทองผลใหม่ทุกเดือน อย่างน้อย 3 รุ่น (generation) เพื่อให้เพลี้ยแป้งปลอดไวรัส ก่อนจะนำไปใช้เป็นพาหะในการถ่ายทอดโรค

2. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวจากแปลงปลูกมาตรวจสอบว่าเป็นไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 (PMWaV-1) หรือ 2 (PMWaV-2) โดยเทคนิคอณูชีววิทยา และเก็บไว้ในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัส

2.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure^{TM}RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

1. เก็บตัวอย่างพืช 1 – 5 มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ – 70 °ซ
2. ดูด Proteinase K (50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางใน 300 ไมโครลิตรของ Tissue and Cell Lysis Solution (1 ตัวอย่าง) ใส่ 5 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
3. บดตัวอย่างพืชใน ไนโตรเจนเหลว และเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร
4. เติมสารละลาย Tissue and Cell Lysis Solution ซึ่งผสมกับ Proteinase K แล้ว (ข้อ 2) 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่ 65 °ซ นาน 15 นาที (ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ทุกๆ 5 นาที) นำสารละลายเซลล์พืชที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที
6. เติม MPC Protein Precipitation Reagent 175 ไมโครลิตร. ในสารละลายของ RNA ของเซลล์พืช 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นาน 10 วินาที
7. นำมาปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
8. ทิ้งตะกอน และเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่
9. เติม Isopropanal 500 ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่ -20 °ซ แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง
10. นำสารละลายข้อ 4 มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ นาน 10 นาที
11. ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)
12. dry ตะกอนใน 37°ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง
13. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

2..2 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละ strain (Sether and Hu, 2002a) ได้แก่

Pa222-F1	5′-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3′	PMWaV-1
Pa223-R1	5′-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3′	
Pa224-F2	5′-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3′	PMWaV-2
Pa225-R2	5′-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3′	

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

RT-PCR Profile

<u>20 ul. Reaction</u> **(ใช้ชุดของ Bioneer)**

dH_2O	6 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	1 ไมโครลิตร
RNA template	5 ไมโครลิตร
บ่มที่ 95 °ซ 3 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง.อีก 5 นาที จากนั้นเติม	
5X RT buffer	4 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
DTT	2 ไมโครลิตร
บ่มที่ 37 °ซ 10 นาที แล้วเติม	
M-MLV Reverse Transcriptase	1 ไมโครลิตร
บ่มที่ 45 °ซ 50 นาที	

PCR Profile

<u>20 ul. Reaction</u>

GoTaq®Green Master Mix (Promega)	10.0 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
Primer F (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
dH_2O	6.0 ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	3.0 ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

94 °ซ	5 นาที	
94 °ซ	1.30 นาที	35 รอบ
55 °ซ	1.30 นาที .	
72 °ซ	1.30 นาที.	
72 °ซ	10 นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

3. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

รวบรวมหน่อพันธุ์สับปะรดที่แข็งแรง ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยว จากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี จำนวน 20 หน่อ มาตรวจสอบว่าปลอดไวรัสทั้งสอง strain หรือไม่ ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นนำมาเก็บรักษาในโรงเรือนกันแมลง และใส่ปุ๋ยบำรุงต้นให้มีอายุประมาณ 3-4 เดือน ก่อนจะนำไปใช้เป็นพืชทดลองในการทดสอบการถ่ายทอดโรคเหี่ยวโดยเพลี้ยแป้ง

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2551 – กันยายน 2553

สถานที่ - กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เพลี้ยแป้งที่ใช้เป็นพาหะในการทดสอบ

เพลี้ยแป้งทั้งสีชมพูจากแปลงปลูกสับปะรด สามารถขยายพันธุ์ได้ดีบนผลฟักทอง และถ้าให้เพลี้ยแป้งอยู่ในที่มืด โดยนำกล่องกระดาษมาครอบกล่องเลี้ยงอีกชั้นหนึ่ง เพลี้ยแป้งจะขยายพันธุ์ได้ดีกว่าการเลี้ยงในที่สว่าง ทั้งนี้เพราะในธรรมชาติเพลี้ยแป้งสีชมพูมักอาศัยอยู่ตามซอกกาบใบโคนต้น หรือบริเวณรากสับปะรด

2. การเตรียมแหล่งของไวรัส

นำหน่อสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยว จากแหล่งปลูก มาตรวจสอบว่าเกิดจากไวรัส PMWaV-1 หรือPMWaV-2 โดยเทคนิค RT-PCR จากนั้นนำมาปลูกในกระถาง อย่างละ 3 กระถาง และเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อใช้เป็นแหล่งของไวรัสในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัส

หน่อสับปะรดที่นำมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จำนวน 20 หน่อ โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า มี 12 หน่อที่ปลอดไวรัส จึงได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ย หน่อสับปะรดซึ่งเก็บไว้ในกรงกันแมลง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งปลอดไวรัสให้มีเพียงพอ และรอให้หน่อมีอายุที่เหมาะสำหรับใช้ในการถ่ายทอดไวรัสต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจและเก็บเพลี้ยแป้งสีชมพูจากแปลงที่ จ. เพชรบุรี มาเลี้ยงให้ปลอดไวรัสในกรงกันแมลง จากนั้นนำหน่อสับปะรดมาตรวจสอบว่าปลอดไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จำนวน 20 หน่อ โดยเทคนิค RT-PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-1 ได้แก่ Pa222-F1 (5′-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3′) และ Pa223-R (5′-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3′) จะให้แถบ band ของดีเอ็นเอ ขนาด 589 คู่เบส สำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจ PMWaV-2 คือ Pa224-F2 (5′-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3′) และ Pa225-R2 (5′-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3′) ให้แถบ bandของดีเอ็นเอ ขนาด 609 คู่เบส พบว่า มี 12 หน่อที่ปลอดไวรัส จึงได้นำมาปลูกในกระถาง ดูแลใส่ปุ๋ยหน่อสับปะรดซึ่งเก็บไว้ในกรงกันแมลง ขณะนี้อยู่ในขั้นตอนเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งปลอดไวรัสให้มีเพียงพอ และรอให้หน่อมีอายุที่เหมาะสำหรับใช้ในการถ่ายทอดไวรัสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2546. ศัตรูสับปะรด เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. 44 หน้า.

ชำนาญ พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. 2540. การป้องกันกำจัดมดในไร่สับปะรด. รายงานผลงานวิจัย กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. โรเนียว 21 หน้า.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุลชัย และ จารุวรรณ คุณาบุตร. 2546. เทคโนโลยีการผลิตและการแปรรูปสับปะรด. เทคโนโลยีการผลิตสับปะรดรับรองคุณภาพ. หน้า 1-22.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช 17 (1-2) : 48-53.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort*. (ISHS) 334:383-386.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric*. 29: 337-348.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Sether, D.M., A.V. Karasev, C. Okumura, C. Arakawa, F. Zee, M.M. Kislan, J.L. Busto and J.S. Hu. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. Plant Disease 85: 856-864.

Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. Mc Geoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner. 2000. Virus Taxonomy seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego. 1162 p

การคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดจากไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว

Selection and Propagation of Pineapple Suckers Free From *Pineapple mealybug wilt-associated virus*

วันเพ็ญ ศรีทองชัย มัลลิกา นวลแก้ว สาวิตรี เขมวงศ์ เขมิกา โขมพัตร
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการสำรวจและเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับปะรดจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 309 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสจำนวน 37 หน่อ จึงนำมาขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับปะรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอร็อกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ขณะนี้ขยายปริมาณต้นอ่อนสับปะรดให้ได้ปริมาณ 300 ขวด และส่งให้ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี 150 ขวด เพื่อดำเนินการขยายต้นอ่อนและเร่งรากในอาหารสูตร MS+IBA 0.5 ppm ให้ได้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ และได้ทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 1,400 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี และจะได้มีการสุ่มตรวจไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นสับปะรดเหล่านี้ต่อไป

รหัสการทดลอง 01 08 49 01 02 01 04 51

คำนำ

สับปะรด [*Ananas comosus* (L.) Merr.] อยู่ในวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ มีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

ศัตรูพืชเป็นอุปสรรคสำคัญในการปลูกสับปะรด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพสับปะรดเสียหายอย่างรุนแรง จนบางครั้งไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ ศัตรูสำคัญที่สุดที่กำลังเป็นปัญหาสำคัญต่อการปลูกสับปะรดของไทยในปัจจุบัน ได้แก่ โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple)โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35 x 10^6 ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์ คลอสเตอโรวิริดี (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993) สามารถตรวจสอบและจำแนกชนิดของ PMWaVs โดยเทคนิค RT-PCR (Sether and Hu, 2002a, 2002b)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al*., 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al*, 1992)

โรคเหี่ยวสับปะรดสามารถติดไปกับหน่อพันธุ์ ในปัจจุบันมีการนำหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาดไปปลูกหรือขยายพันธุ์ในแหล่งที่ยังไม่มีโรคนี้ระบาด ทำให้โรคเหี่ยวแพร่ระบาดจากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่งได้รวดเร็วยิ่งขึ้น เนื่องจากอาจมีไวรัสแฝงอยู่ในหน่อพันธุ์แม้ว่าจะไม่แสดงอาการของโรคให้ก็ตาม (วันเพ็ญ, 2546) ถ้าสับปะรดมีราคาสูงขึ้น ยิ่งทำให้เกิดความขาดแคลนหน่อพันธุ์ที่จะนำมาปลูก ทำให้เกษตรกรซื้อหน่อพันธุ์จากแหล่งที่มีโรคระบาดมาปลูกและเก็บหน่อพันธุ์เหล่านี้ไว้ใช้ในฤดูถัดไป ปัญหาดังกล่าวนี้เคยเกิดขึ้นในฮาวาย จึงได้มีการผลิตหน่อพันธุ์ปลอดโรค

โดยอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อนำไปปลูกขยายในแปลงและใช้ในงานทดลองด้านการถ่ายทอดโรค (Sether *et al*., 1998) ในประเทศไทยมีนักวิจัยทำการศึกษาเรื่องการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่อพันธุ์สับปะรด (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในกระบวนการขยายพันธุ์สับปะรดปลอดโรคเหี่ยวได้ ฉะนั้นควรมีการดำเนินการคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดโรค เพื่อปลูกทดแทนหน่อที่มีเชื้อไวรัสติดไปและแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หน่อพันธุ์สับปะรดที่ปลอดโรค
2. อุปกรณ์และสารเคมีในการเพาะเลี้ยงเยื่อพืช
3. ห้องควบคุมอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยงเยื่อพืช
4. อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคอณูชีววิทยา
5. สารเคมีสำหรับใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชในโรงเรือนทดลอง

วิธีการ

1. การตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดที่ได้จากแหล่งปลูกที่ไม่มีโรคเหี่ยวระบาด โดยเทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

สำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จากนั้นเก็บตัวอย่างต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวในพื้นที่ดังกล่าว และนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR
โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังนี้

1.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของไวรัสจากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure^{TM}RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

1. เก็บตัวอย่างพืช 1 – 5 มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ – 70 °ซ
2. ดูด Proteinase K (50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางใน 300 ไมโครลิตรของ Tissue and Cell Lysis Solution (1 ตัวอย่าง) ใส่ 5 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร
3. บดตัวอย่างพืชใน ไนโตรเจนเหลว และเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4. เติมสารละลาย Tissue and Cell Lysis Solution ซึ่งผสมกับ Proteinase K แล้ว (ข้อ 2) 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่ 65 °ซ นาน 15 นาที (ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ทุกๆ 5 นาที) นำสารละลายเซลล์พืชที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที
6. เติม MPC Protein Precipitation Reagent 175 ไมโครลิตร. ในสารละลายของ RNA ของเซลล์พืช 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นาน 10 วินาที
7. นำมาปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
8. ทิ้งตะกอน และเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่
9. เติม Isopropanal 500 ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่ -20 °ซ แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง
10. นำสารละลายข้อ 4 มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ นาน 10 นาที
11. ล้างตะกอนด้วย 75 % ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)
12. dry ตะกอนใน 37°ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง
13. ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

1.2 การเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละ strain (Sether and Hu, 2002a) ได้แก่

Pa222-F1	5′-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC-3′	PMWaV-1
Pa223-R1	5′-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3′	
Pa224-F2	5′-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3′	PMWaV-2
Pa225-R2	5′-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3′	

โดยใช้ปฏิกิริยาดังนี้

RT-PCR Profile

<u>20 ul. Reaction</u> **(ใช้ชุดของ Bioneer)**

dH_2O	6 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	1 ไมโครลิตร
RNA template	5 ไมโครลิตร

บ่มที่ 95 °ซ 3 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็ง.อีก 5 นาที จากนั้นเติม

5X RT buffer	4 ไมโครลิตร
10 mM dNTP	1 ไมโครลิตร
DTT	2 ไมโครลิตร
บ่มที่ 37 °ซ 10 นาที แล้วเติม	
M-MLV Reverse Transcriptase	1 ไมโครลิตร
บ่มที่ 45 °ซ 50 นาที	

PCR Profile

<u>20 ul. Reaction</u>

GoTaq® Green Master Mix (Promega)	10.0 ไมโครลิตร
Primer R (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
Primer F (100 พิโคโมล)	0.5 ไมโครลิตร
dH_2O	6.0 ไมโครลิตร
Template (ที่ได้จาก RT-PCR)	3.0 ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

94 °ซ	5 นาที	
94 °ซ	1.30 นาที	35 รอบ
55 °ซ	1.30 นาที .	
72 °ซ	1.30 นาที.	
72 °ซ	10 นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

การตรวจสอบหาไวรัส PMWaVs เริ่มตรวจสอบ PMWaV-1 ที่ติดมากับหน่อพันธุ์ก่อน หลังจากนั้นนำหน่อที่ตรวจไม่พบไวรัส PMWaV-1 มาตรวจหา PMWaV-2 อีกครั้ง

สำหรับการตรวจสอบไวรัส PMWaV1,2 ในจังหวัดสงขลา พัทลุง และตรัง ใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอของบริษัท Rochs และเพิ่มปริมาณ cDNA และอ่านค่าวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Real-time PCR

2. ขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัส มาฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อพันธุ์โดยแช่

หน่อใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 15 นาที ก่อนย้ายไปแช่ใน 0.3% ไฟซาน (physan) นาน 30 นาที จากนั้นนำหน่อมาแช่ใน 10 % คลอร็อกซ์ (clorox) ที่มี 0.01% ทวีน 20 (Tween 20) ผสมอยู่ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 15 นาที ฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งใน 5% คลอร็อกซ์ ที่มี 0.01% ทวีน 20 ผสมอยู่ และเขย่าด้วยเครื่องเขย่า นาน 10 นาที ล้างหน่อด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 5 นาที ผึ่งให้แห้งพอหมาดๆ แล้วตัดแบ่งหน่อเป็น 4 ส่วน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) (สถาบันวิจัยพืชสวน, 2546) นอกจากนี้ยังได้ทำการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อ โดยเปลี่ยนขั้นตอนจากสาร คอปเปอร์ออสซีคลอไรด์ และ เมอร์คิวริค คลอไรด์ เป็นสาร ไฟซาน (physan) และ แอลกอฮอล์ (ethanol) โดยเริ่มจากการแช่หน่อใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 15 นาที ก่อนย้ายไปแช่ใน 0.3% ไฟซาน นาน 30 นาที เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่ติดอยู่ในหน่อพันธุ์ หลังจากตาเจริญเป็นหน่อใหม่ ประมาณ 6 สัปดาห์ ทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน จนได้จำนวนต้นอ่อนในปริมาณมากพอ ให้ย้ายเป็นต้นเดี่ยวลงเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดราก (MS+IBA 0.5 ppm) และสุ่มตรวจสอบว่าต้นเหล่านี้ยังปลอดไวรัสหรือไม่ โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

3. ปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

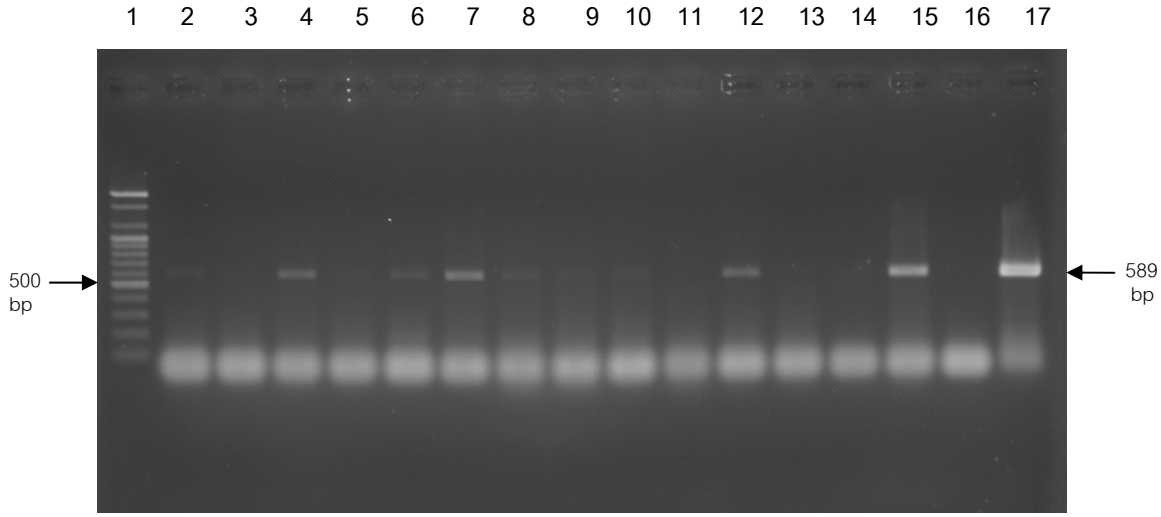
นำต้นอ่อนสับปะรดปลอดโรคที่ชักนำให้เกิดรากแล้วในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มาปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 1400 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาลของศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด เพื่อขยายเพิ่มปริมาณหน่อสับปะรดปลอดโรคต่อไป

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2550 - กันยายน 2553
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดที่ได้จากแหล่งปลูกที่ไม่มีโรคเหี่ยวระบาด โดยเทคนิคอณูชีววิทยา (RT-PCR)

จากการสำรวจพื้นที่ปลูกสับปะรด ในศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จากนั้นเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ดังกล่าว จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า การตรวจสอบไวรัส PMWAV-1 โดยใช้ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1 จะให้แถบ band ขนาด 589 คู่เบส ในการวิเคราะห์ผลด้วย agarose gel electrophoresis (ภาพที่ 1) และการตรวจหาไวรัส PMWAV-2 โดยใช้ไพรเมอร์ Pa224-F2 และ Pa225-R2 ให้แถบ band ขนาด 609 คู่เบส (ภาพที่ 2) พบว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสทั้งสอง strain 23 จากหน่อที่เก็บจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี จากนั้นได้นำหน่อเหล่านี้มาขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สำหรับสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากแปลงปลูกในศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และในศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง แหล่งละ 100 ตัวอย่าง พบว่ามีต้นที่ปลอดไวรัสทั้งสอง strain จำนวน 46 และ 34 ต้น ตามลำดับ จากนั้นนำมาเลี้ยงให้แตกหน่อและเก็บหน่อพันธุ์เพื่อยืนยันผลวิเคราะห์อีกครั้ง ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ปลอดไวรัสทั้ง 2 strain เพียง 14 หน่อ หลังจากนั้นส่งให้กลุ่มงานไวรัสวิทยานำไปขยายพันธุ์โดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป



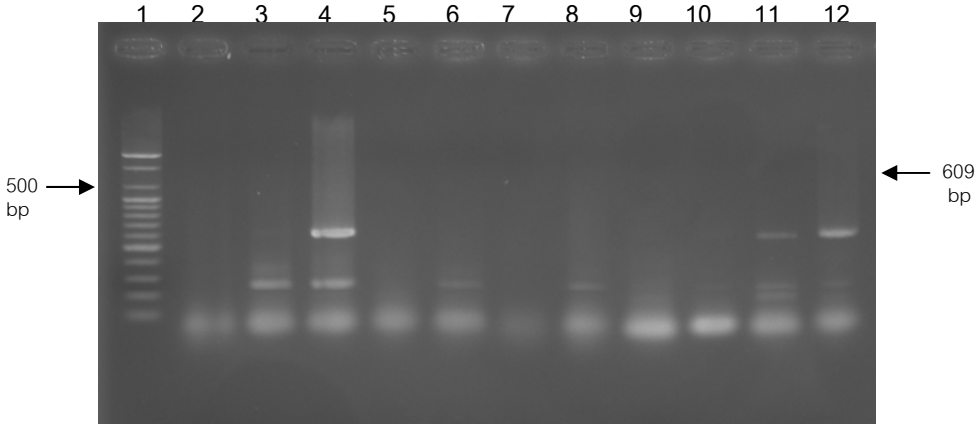
ภาพที่ 1. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-1 ของสับปะรดโดยใช้ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1

1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)

2-15 : ตัวอย่างสับปะรดที่เก็บจากแปลง

16 : ต้นปกติ

17 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-1



ภาพที่ 2. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-2 ของสับปะรดโดยใช้ ไพรเมอร์ Pa224-F1 และ Pa225-R1

1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)

2-15 : ตัวอย่างสับปะรดที่เก็บจากแปลง

16 : ต้นปกติ

17 : ต้นเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-2

2. ขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการทดลองพบว่า การฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับปะรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอร็อกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี อาจเป็นเพราะว่า ไฟซาน สามารถใช้ในการฆ่าเชื้อรา แบคทีเรีย และสาหร่าย ซึ่งนิยมใช้กับกล้วยไม้ และเป็นสารไม่มีสีทำให้หน่อหลังฟอกดูสะอาด ไม่เหมือนกับการใช้คอปเปอร์ออสซีคลอไรด์ ซึ่งทำให้หน่อมีสีฟ้าปนเปื้อน

หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ขณะนี้ดำเนินการขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดโรคในอาหารสูตรเร่งต้นอ่อน จำนวน 300 ขวด พร้อมมีการสุ่มตรวจหน่อสับปะรดในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่า ไม่มีการปนเปื้อนของไวรัสสาเหตุของโรคเหี่ยว จากนั้นได้ส่งหน่อพันธุ์ปลอดไวรัสจำนวน 150 ขวด ไปเลี้ยงในอาหารเร่งรากที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ด้วยอาหารสูตร MS ที่มี IBA 0.5 ppm ขณะนี้สามารถเพิ่มปริมาณหน่อปลอดโรคได้จำนวน 574 ขวด และต้นขนาดเล็กที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร MS ที่มี BA 1 ppm จำนวน 228 ขวด เพื่อจะนำลงปลูกในดินต่อไป นอกจากนี้ได้นำหน่อปลอดโรคจากจังหวัด

สงขลาและตรังที่ผ่านการตรวจสอบเรียบร้อยแล้ว จำนวน 14 หน่อ มาฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้นอ่อน พบว่า เริ่มมีหน่ออ่อนสีเขียวเจริญจากตา และมีการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียประมาณ 10-15% ขณะนี้ได้ต้นอ่อนและกำลังเพิ่มปริมาณจำนวนต้นอ่อนในอาหารสูตรเร่งต้น

3. ปลูกขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคเหี่ยวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ได้นำต้นอ่อนของสับปะรดปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 1400 ต้น ออกปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี และจะได้มีการสุ่มตรวจไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นสับปะรดเหล่านี้ต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บต้นสับปะรดที่มีลักษณะสมบูรณ์ในพื้นที่ปลูกสับปะรดจากศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่สงขลา และศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตตรัง จำนวน 109 100 และ 100 ต้น ตามลำดับ รวมเป็น 309 หน่อ หลังจากนำมาตรวจสอบไวรัสของโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWAV-1 & PMWAV-2) ด้วยเทคนิค RT-PCR ผลปรากฏว่า มีหน่อสับปะรดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าปลอดไวรัสจำนวน 37 หน่อ จึงนำมาขยายหน่อพันธุ์ปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช พบว่าการฟอกฆ่าเชื้อที่ติดมากับหน่อสับปะรดปลอดไวรัส ด้วย 0.3% ไฟซาน , 10 % และ 5% คลอร็อกซ์ และ 70% แอลกอฮอล์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ดี หลังจากเลี้ยงหน่อปลอดโรคในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรชักนำให้เกิดการแตกกอ (สูตรอาหาร MS + BA 1 ppm) ตาเจริญเป็นหน่ออ่อนภายใน 6 สัปดาห์ จึงทำการตัดแยก (subculture) ลงเลี้ยงในสูตรอาหารชักนำให้เกิดการแตกกอ เพื่อเพิ่มปริมาณต้นอ่อน และย้ายอาหารทุก 1-2 เดือน ขณะนี้ขยายปริมาณต้นอ่อนสับปะรดให้ได้ปริมาณ 300 ขวด และส่งให้ศูนย์วิจัยพืชสวนเพชรบุรี 150 ขวด เพื่อดำเนินการขยายต้นอ่อนและเร่งรากในอาหารสูตร MS+IBA 0.5 ppm ให้ได้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ และได้ทำการย้ายปลูกในวัสดุปลูก (ดิน : ขี้เถ้าแกลบ : ขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1 : 1 : 1) จำนวน 1,400 ต้น ดูแลรักษาภายใต้โรงเรือนอนุบาล และให้ปุ๋ยละลายน้ำสูตร 16-16-16 สัปดาห์ละ 1 ครั้ง และพ่นสารกำจัดเพลี้ยแป้งเดือนละ 1 ครั้ง พร้อมทั้งโรยยากำจัดมด พบว่าทุกต้นมีการเจริญเติบโตได้ดี และจะได้มีการสุ่มตรวจไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวในต้นสับปะรดเหล่านี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551. 51 หน้า.

สถาบันวิจัยพืชสวน. 2546. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสวน เอกสารวิชาการ กรมวิชาการเกษตร. 156 หน้า.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช 17 (1-2) : 48-53.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort*. (ISHS) 334:383-386.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric*. 29: 337-348.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Sether, D.M., D.E. Ullman and J.S. Hu. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus* spp.). Phytopathology 88: 1224-1230.

Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002a. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. Phytopathology 92: 928-935.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002b. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt assoiated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawii. *Plant Dis*. 86: 867-874.

การสำรวจและรวบรวมวัชพืชในมันฝรั่ง

Survey and Collection of Weed Species in Potato.

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์[1] เบญจมาภรณ์ ลิ้มประเสริฐ[2] มัตติกา ทองรส[3]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2]สำนักการเกษตรอำเภอดำเนินสะดวก [3]สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

บทคัดย่อ

การสำรวจและรวบรวมวัชพืชในแปลงปลูกมันฝรั่ง ได้ดำเนินงานในแหล่งปลูกมันฝรั่งที่ภาคเหนือ คือจังหวัดลำพูนที่อำเภอทุ่งหัวช้าง เชียงใหม่ที่อำเภอไชยปราการ อำเภอสันทราย แม่ฮ่องสอนที่อำเภอปางมะผ้า แลภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดสกลนครที่อำเภอโคกศรีสุพรรณ อำเภอเมือง อำเภอพรรณนานิคม และอำเภอพังโคน และภาคตะวันตกที่อำเภอพบพระ ช่วงเวลาดำเนินงานตั้งแต่ตุลาคม 2550 ถึงกันยายน 2552 ทำการสำรวจโดยใช้แปลงสุ่ม (Sampling plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี unrestricted sampling method พบวัชพืชทั้งหมด 43 ชนิด จำแนกได้ 19 วงศ์ (family) 39 สกุล (genus) 43 พันธุ์ (species) วิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative characteristic) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงโดยอาศัยค่าของ SDR (sum dominance ratio) สามารถจัดกลุ่มวัชพืชเด่น (dominant species) ได้วัชพืช 3 ชนิดคือ สาบแร้งสาบกา (*Ageratum conyzoides* L.) หญ้านกสีชมพู (*Echinochloa colona* (L.) Link.) และ หญ้ายาง (*Euphorbia heterophyllum* L.) มีค่า SDR 11.5, 9.9 และ 9.4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ วัชพืชเด่นลำดับรอง (Co-dominant species) มี 5 ชนิดเช่นกันได้แก่ หญ้าตีนกา (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) หญ้าตีนนก (*Digitaria adscendens* (L.) Scop. กระดุมใบใหญ่ (*Borreria latifolia* (Aubl), Schum.) หญ้าตีนติด (*Brachiaria reptan* (L.) & Hubb.) และ สะเดาดิน (*Hydrolea zeylanica* (L.)Valh.) มีค่า SDR 8.6, 8.0, 5.8, 5.4 และ 5.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รายชื่อวัชพืชที่ได้จากการสำรวจนั้น สามารถนำไปจัดทำบัญชีรายชื่อประกอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest risk analysis) ในการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งตามข้อตกลงมาตรการสุขอนามัยพืช (SPS Agrement) รวมถึงได้ตัวอย่างวัชพืช และเมล็ดเพื่อเป็นหลักฐานการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป

รหัสโครงการวิจัย 09 02 49 01

คำนำ

มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) เป็นพืชล้มลุกจัดอยู่ในวงศ์ solanaceae **ลำต้น**ตั้งตรงสูง 50-100 เซนติเมตร มีขนบาง ๆ ตามลำต้น **ใบ**เป็นใบประกอบมีใบย่อยหลายคู่ ปลายคี่ **ดอก**เป็นดอกช่อ **ช่อดอก**ย่อยเป็นช่อกระจุก ดอกย่อยเป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอก 5 สีขาว น้ำเงิน แดง และม่วง **ผล** กลมคล้ายมะเขือเทศ หัวมันฝรั่งเป็นส่วนของไหลหรือลำต้นใต้ดินที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่สะสมอาหาร หัวมันฝรั่งมีตา เปรียบเสมือนเป็นข้อของลำต้น ตานี้จะเจริญเป็นหน่อหรือต้นได้หัวมันฝรั่งมีรูปร่างตั้งแต่กลมกึ่งกลมรีและรูปร่างยาว (http:mygirl121.exteen.com./20080908/entry-15)

มันฝรั่งหรือมีชื่อเรียกอีกว่า มันอลู ตามคำเรียกของชาวอินเดีย มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ บริเวณประเทศเปรู และเริ่มนำเข้าไปปลูกในประเทศไอร์แลนด์ในต้นศตวรรษที่ 18 จึงนิยมเรียกว่า ไอริสโฟเตโต้ แหล่งปลูกมันฝรั่งที่เหมาะสมและให้ผลผลิตสูงนั้น จำเป็นต้องมีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำระหว่าง 15–18 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังต้องการความยาวแสงหรือช่วงเวลากลางวัน 12-13 ชั่วโมง ดังนั้นแหล่งปลูกมันฝรั่งของประเทศไทยจึงอยู่ที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และการปลูกมันฝรั่งนั้นสามารถปลูกได้ทั้งในและนอกฤดูกาล การปลูกในฤดูเริ่มตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน และเก็บเกี่ยวในเดือนมีนาคม แหล่งปลูกสำคัญอยู่มี่อำเภอแม่แตง สันทราย ไชยปราการ และฝาง การปลูกนอกฤดูกาลมักปลูกตามไหล่เขา เช่นที่ อำเภอเชียงดาว การปลูกนอกฤดูแบ่งออกเป็น 2 รุ่นคือ รุ่นแรกปลูกเดือนเมษายน และเก็บเกี่ยวในเดือนสิงหาคม ส่วนรุ่นที่ 2 ปลูกในเดือนกรกฎาคมและเก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม พันธุ์มันฝรั่งที่นิยมปลูกในประเทศไทยที่นิยมปลูกมี 2 พันธุ์ คือ สปุนต้า และ แคนทิแบค (http://siweb.bss.go.th/qa/search-description.asp?QA-ID=196) พื้นที่ปลูกมันฝรั่งส่งโรงงานในปี 2550 มีพื้นที่เพาะปลูก 45,963 ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี 2546 ซึ่งมีพื้นที่ปลูกเพียง 35,928 ไร่

ปัจจุบันคนไทยนิยมบริโภคมันฝรั่งเพิ่มมากขึ้นทั้งอาหารประเภทเร่งด่วน และอาหารว่างประเภทขบเคี้ยว ดังนั้นมันฝรั่งซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตอาหารดังกล่าวจึงเพิ่มปริมาณความต้องการมากขึ้น จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่เกษตรกรนิยมปลูกในภาคเหนือ และให้ผลตอบแทนสูงเมื่อเทียบกับพืชอื่น ๆ โดยจะมีกำไรอยู่ระหว่าง 6,000-9,000 บาทต่อไร่ แต่การปลูกมันฝรั่งนั้นต้องนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งจากต่างประเทศ ในปี พ.ศ.2550 มีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งพันธุ์โรงงานปริมาณ 3,863 ตัน มูลค่า 98.2 ล้าน

การนำเข้าสินค้าเกษตรนั้น หากไม่มีมาตรการสุขอนามัยพืชที่เข้มแข็ง นอกจากจะเสียเปรียบประเทศคู่ค้าแล้ว ยังมีผลทำให้เกิดปัญหาของศัตรูพืชชนิดที่ไม่เคยพบในประเทศไทยติดมากับสินค้าที่นำเข้า และแพร่กระจายเป็นศัตรูพืชชนิดใหม่ทำให้เกิดผลเสียต่อผลผลิตการเกษตรภายในประเทศ การสำรวจศัตรูพืชในมันฝรั่งจึงเป็นสิ่งจำเป็นด้านหนึ่ง เพื่อจะได้ข้อมูลในการจัดทำ

บัญชีรายชื่อศัตรูพืชประกอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชเบื้องต้นของพืชนำเข้า ในด้านของวัชพืชนั้น ยังขาดรายงานที่เป็นวิชาการเกี่ยวกับการสำรวจวัชพืชในมันฝรั่ง ดังนั้นจึงได้ดำเนินงานด้านการสำรวจวัชพืชตามแหล่งปลูกมันฝรั่งของประเทศ เพื่อจะได้ข้อมูลเป็นหลักฐานอ้างอิงทางวิชาการต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แปลงสุ่ม (Sample Plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร
- เลนส์ขยาย และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องตา
- กล้องบันทึกภาพ
- วัสดุ และอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเช่น กรรไกร ถุงพลาสติก เฟรมอัดตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์/กระดาษฟาง กระดาษลูกฟูก และเชือกหรือสายรัด
- อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูล เช่น กระดาษ หรือแบบฟอร์มในการบันทึกข้อมูล
- เอกสารและตำราประกอบการจำแนกและระบุชื่อพืช

วิธีการ

1. การค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลวิชาการ

ค้นคว้าเอกสารวิชาการต่าง ๆ เกี่ยวกับมันฝรั่งเช่น ชนิดและพันธุ์ของมันฝรั่ง การเขตกรรมและดูแลด้านศัตรูพืช ปัญหาและการแพร่ระบาดของวัชพืช เป็นต้น

2. การสำรวจ และรวบรวมชนิดวัชพืช

วางแผนการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกมันฝรั่ง ซึ่งมีแหล่งปลูกไม่มากนักเมื่อเทียบกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ และเนื่องจากมันฝรั่งเจริญเติบโตได้ดี ให้ผลผลิตสูงในสภาพอากาศค่อนข้างเย็น ดังนั้นพื้นที่ที่จะสำรวจนั้น จึงอยู่ในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ สำหรับภาคเหนือนั้นได้สำรวจวัชพืชในแปลงปลูกมันฝรั่งที่ จังหวัดลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน และเชียงราย และภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่จังหวัด สกลนคร นครพนม และมุกดาหาร และภาคตะวันตก ที่จังหวัดตาก

วิธีสุ่มตัวอย่างวัชพืชในการสำรวจนั้นใช้แปลงสุ่ม (sample plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี Unrestricted sampling method (Anonymous, 1982) ทำการสุ่ม 4 จุดต่อหนึ่งแปลง บันทึกจำนวนชนิด นับปริมาณวัชพืชแต่ละชนิด และหาชื่อวัชพืช บันทึกภาพ เก็บตัวอย่างวัชพืชที่สมบูรณ์ คือมีส่วนของราก ต้น ใบ และดอก อัดไว้ในแผงไม้ เพื่อนำมาตากแห้ง รวมถึงการเก็บเมล็ดที่สมบูรณ์ และเก็บรักษาไว้ที่ห้องเก็บตัวอย่างพรรณไม้ เพื่อใช้ในการศึกษาและเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลต่อไป ส่วนการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative

characteristic) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงเพื่อจัดลำดับวัชพืชเด่น (dominant species) และวัชพืชรอง (co-dominant species) นั้นได้อาศัยค่าของ sum dominance ratio ซึ่งคำนวณได้จากค่า relative density และค่า relative frequency จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Relative density (RD)} = \frac{\text{Density for a species x 100}}{\text{Total density for all species}}$$

$$\text{Relative frequency (RF)} = \frac{\text{Frequency value for a species x 100}}{\text{Total frequency value for all species}}$$

$$\text{Sum dominant ratio (SDR)} = \frac{\text{RD + RF}}{2}$$

การแบ่งหมวดหมู่วัชพืช (classification) และการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ (identification) นั้นได้อาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของนักวิชาการและเอกสารวิชาการดังต่อไปนี้

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.

2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.

3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.

4. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.

5. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.

6. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.

7. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.

8. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.

9. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.

10. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.

11. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาในการดำเนินงาน ตั้งแต่สืบค้นข้อมูล วางแผนการสำรวจ และสำรวจวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช ได้ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2550 ถึงเดือนกันยายน 2552

ผลการวิจารณ์ผลการศึกษา

การปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรมีทั้งแบบปลูกไม่ยกร่อง และยกร่อง การปลูกแบบไม่ยกร่องนั้น จะขุดร่องตามแนวยาวแปลงลึกประมาณ 1 หน้าจอบ ระยะระหว่างร่อง 75-90 เซนติเมตร วางหัวพันธุ์มันฝรั่งในร่องห่างตกัน 20-30 เซนติเมตร แล้วกลบ เป็นวิธีที่นิยมปลูกที่อำเภอพบพระ จังหวัดตาก การปลูกแบบยกร่องก็จะมีทั้งปลูกแบบแถวเดี่ยว และแถวคู่ ถ้าปลูกแถวเดี่ยวสันร่องจะกว้าง 75-90 เซนติเมตร ถ้าปลูกแถวคู่สันร่องกว้าง 1-1.2 เมตร การจะปลูกวิธีไหนแล้วแต่ความชำนาญของเกษตรกร และการใช้เครื่องจักรกล สำหรับการกำจัดวัชพืชนั้น มักจะใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดคุมการงอกของเมล็ดวัชพืช เช่น เมทริบูซิน พ่นหลังจากปลูกมันฝรั่งและก่อนวัชพืชงอก และการกำจัดวัชพืชโดยใช้แรงงานถอนหรือใช้จอบดาย ในแปลงที่เกษตรกรมีการวางแผนการกำจัดวัชพืชที่มีประสิทธิภาพ มักจะไม่ประสบกับปัญหาวัชพืชมากเท่ากับโรคและแมลง

มีรายงานชนิดวัชพืชในแปลงมันฝรั่งซึ่งได้แก่ หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก หญ้าแพรก หญ้าไม้กวาด หญ้าปากควาย หญ้าตีนกา หญ้าหางหมา กะเม็ง ผักปลาบ หญ้ายาง เซ่งใบยาว ตีนตุ๊กแก เทียนนา โทงเทง น้ำนมราชสีห์ ปอป่า ผักโขม ผักคราดหัวแหวน ผักโขมหิน ผักแครด ผักเบี้ยหิน ผักเบี้ยใหญ่ ผักเผ็ดแม้ว ผักเสี้ยน ไมยราบเครือ สาบแร้งสาบกา หญ้ากำมะหยี่ เขมรเล็ก หญ้างวงช้าง หญ้าละออง อีเหนี่ยว ผักไผ่น้ำ แห้วหมู และกกทราย (นิรนาม , 2547)

วัชพืชที่สำรวจพบในแปลงปลูกมันฝรั่งตามแผนและวิธีการที่ได้กำหนดไว้นั้น พบวัชพืชทั้งหมด 43 ชนิด จำแนกได้ 19 วงศ์ (family) 39 สกุล (genus) 43 พันธุ์ (species) และจากการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณของวัชพืชที่สำรวจได้ทั้งหมด เพื่อจัดกลุ่มวัชพืชตามค่า SDR ได้ 4 กลุ่ม ดังนี้ (ตารางที่ 1)

1. กลุ่มวัชพืชเด่น (dominant species) เป็นกลุ่มวัชพืชที่พบในปริมาณมากและจำนวนครั้งในการสำรวจพบบ่อยกว่าวัชพืชนิดอื่น ๆ พบทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ สาบแร้งสาบกา หญ้านกสีชมพู และหญ้ายาง มีค่า SDR 11.5, 9.9 และ 9.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

2. กลุ่มวัชพืชเด่นลำดับรอง (co-dominant species) เป็นกลุ่มวัชพืชที่พบในลำดับรอง มีค่า SDR 8.6, 8.0, 5.8 และ 5.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3. กลุ่มวัชพืชที่พบระดับปานกลาง มีจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ ผักขม ส้มกบ(ดอกชมพู) กระดุมขน แห้วหมู ผักแครด ผักงวงช้าง หญ้าแพรก หญ้าคออ่อน กะเม็ง ผักคราดหัวแหวน ผักเบี้ยหิน เซ่งใบมน และ กระดุมใบเล็ก มีค่า SDR 1.0 - 4.6 เปอร์เซ็นต์

4. กลุ่มวัชพืชที่พบในระดับน้อย มีค่า SDR ต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 22 ชนิด คือ ผักกาดนา ผักปลาบ หญ้าข้าวนก ผักเบี้ยใหญ่ ผักขมฝรั่ง ทหารกล้าขน น้ำนมราชสีห์ ปีกนกไส้ ทหารกล้า ส้มกบ โทงเทง ผักขมหนาม ลูกใต้ใบ ส้มกบ หญ้าขจรจบดอกเล็ก ตดหมูตดหมา บัวบก ไมยราบเลื้อย หญ้าโขย่ง หญ้าคา หญ้าปากควาย และมะต่อมเสื้อ

นอกจากรายงานชนิดวัชพืชในภาพรวมทั้งหมดดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังมีข้อมูลชนิดวัชพืชที่พบในแต่ละภาคที่สำรวจ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นชนิดที่ใกล้เคียงกัน

ภาคเหนือ

จังหวัดเชียงใหม่ ได้สำรวจที่ อำเภอไชยปราการ (ตำบลศรีดงเย็น และปงคำ) อำเภอสันทราย (ตำบลแฝกใหม่ และเจดีย์แม่ครัว) พบวัชพืชดังต่อไปนี้ สาบแร้งสาบกา หญ้านกสีชมพู หญ้ายาง หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด ผักขม แห้วหมู กะเม็ง ผักเบี้ยใหญ่ ผักขมฝรั่ง บัวบก ไมยราบเลื้อย และมะต่อมเสื้อ

จังหวัดลำพูน ที่อำเภอทุ่งหัวช้าง วัชพืชที่พบได้แก่ สาบแร้งสาบกา หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก ผักขม แห้วหมู กะเม็ง และ โทงเทง ชนิดวัชพืชพบไม่มากนัก เนื่องจากมีแปลงปลูกมันฝรั่งไม่มาก ประกอบกับเกษตรกรได้มีการกำจัดวัชพืชทั้งใช้แรงงาน และสารกำจัดวัชพืช

ภาคตะวันตก

จังหวัดตาก ที่อำเภอพบพระ เกษตรกรจะปลูกมันฝรั่งมากกว่าจังหวัดอื่น ๆ มีการปลูกมันฝรั่งแทบทุกตำบลที่อำเภอพบพระ เช่น ตำบลช่องแคบ ตำบลรวมไทยพัฒนา ตำบลคีรีราษฎร์ และตำบลเสรีราษฎร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการปลูกมันฝรั่ง 2 ครั้งในแต่ละปีคือช่วงเดือนธันวาคม และเดือนพฤษภาคม วัชพืชที่พบจึงมีมากชนิดกว่าจังหวัดอื่น ๆ แต่ปัญหาเรื่องวัชพืชก็จะไม่มากเนื่องจากเกษตรกรมีการกำจัดวัชพืชอย่างต่อเนื่อง วัชพืชที่พบได้แก่ สาบแร้งสาบกา หญ้ายาง หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก กระดุมใบใหญ่ สะเดาดิน ผักขม ส้มกบ กระดุมขน ผักแครด หญ้างวงช้าง หญ้าแพรก หญ้าคออ่อน กะเม็ง ผักคาดหัวแหวน ผักเบี้ยหิน เซ่งใบมน กระดุม

ใบเล็ก ผักปลาบ หญ้าข้าวนก ผักเบี้ยใหญ่ ผักขมฝรั่ง ทหารกล้าขน น้ำนมราชสีห์ ปีกนกไส้ ทหารกล้า ส้มกบ(ดอกชมพู) โทงเทง ผักขมหนาม ส้มกบ หญ้าขจรจบดอกเล็ก ตดหมูตดหมา ไมยราบเลื้อย หญ้าโขย่ง หญ้าคา และ หญ้าปากควาย

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แปลงปลูกมันฝรั่งไม่มากนัก มีแปลงปลูกมันฝรั่งที่จังหวัดสกลนคร หลายอำเภอคืออำเภอโคกศรีสุพรรณ อำเภอเมือง อำเภอพรรณนานิคม และอำเภอพังโคน วัชพืชที่พบได้แก่ สาบแร้งสาบกา หญ้านกสีชมพู หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้าตีนติด สะเดาดิน ผักขม ส้มกบ หญ้างวงช้าง หญ้าแพรก เซ่งใบมน ผักกาดนา หญ้าข้าวนก และโทงเทง

นอกจากนี้วัชพืชที่สำรวจพบอาจจัดแบ่งกลุ่มของวัชพืชตามลักษณะและขนาดของใบ เพื่อความเหมาะในการเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชตามคุณสมบัติหรือการเลือกทำลายของสารโดยแบ่งได้ 3 กลุ่มคือ

1. กลุ่มวัชพืชใบกว้าง (B) ประกอบด้วยวัชพืชจำนวน 32 ชนิด วัชพืชดังกล่าว มีขนาดของใบกว้างและมีรูปร่างใบหลายแบบ เช่น รูปไข่ รูปกลม หรือเป็นเหลี่ยม เป็นต้น ประกอบด้วยวัชพืชจากหลายวงศ์คือ Asteraceae Euphorbiaceae, Rubiaceae, Hydrophyllaceae, Amaranthaceae, Oxalidaceae, Boraginaceae, Aizoaceae, Sterculiaceae, Portulacaceae, Chenopodiaceae, Solanaceae, Umbeliferae และ Mimosoideae

2. กลุ่มวัชพืชใบแคบ (N) ประกอบด้วยวัชพืชจำนวน 9 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ทั้งหมด เป็นกลุ่มที่มีขนาดของใบแคบ เรียวยาว มีส่วนของแผ่นใบและกาบใบ ลำต้นมีข้อปล้องชัดเจน และใบเรียงเป็น 2 แถว

3. กลุ่มพวกกก เป็นวัชพืชที่มีใบขนาดเล็กเหมือนพวกใบแคบ แต่ไม่มีกาบใบ ลำต้นไม่มีข้อปล้อง มีการเรียงของใบเป็น 3 แถว พบ 1 ชนิด คือ แห้วหมู

ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจนี้จะเป็นเอกสารวิชาการที่เป็นปัจจุบัน สามารถใช้อ้างอิงในการจัดทำบัญชีรายชื่อวัชพืชในมันฝรั่ง เพื่อเป็นข้อมูลประกอบการวิเคราะห์ความเสี่ยงเบื้องต้นของการนำเข้ามันฝรั่ง ในการกำหนดชนิดศัตรูพืชกักกัน (Quarantine Pest) และกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชที่เหมาะสม โดยไม่ขัดแย้งกับข้อตกลงระหว่างประเทศ ซึ่งจะเป็นมาตรการการป้องกันการระบาดของศัตรูพืชต่างถิ่นไม่ให้ระบาดเข้ามาในประเทศไทย นอกจากนี้ยังได้รวบรวมตัวอย่างต้นวัชพืชที่สมบูรณ์ และเมล็ด เพื่อเป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป

สรุปผลการศึกษาและคำแนะนำ

1. การสำรวจและศึกษาชนิดวัชพืชในแปลงปลูกมันฝรั่ง ในแถบภาคเหนือและภาคตะวันตกและตะวันออกเฉียงเหนือ พบวัชพืชทั้งหมด 43 ชนิด จำแนกได้ 19 วงศ์ (family) 39 สกุล (genus) 43 พันธุ์ (species)

2. วัชพืชเด่นในแปลงมันฝรั่ง พิจารณาตามค่า SDR มี 3 ชนิด คือ สาบแร้งสาบกา หญ้านกสีชมพู และหญ้ายาง มีค่า SDR 11.5, 9.9, และ 9.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และพบว่าสาบแร้งสาบกาเป็นวัชพืชที่พบทุกแปลงสำรวจ วัชพืชเด่นลำดับรอง มี 5 ชนิด คือ หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก กระดุมใบใหญ่ หญ้าตีนติด และ สะเดาดิน

3. สามารถจัดกลุ่มวัชพืชตามขนาด และรูปร่างของใบได้ 3 กลุ่มคือ กลุ่มวัชพืชใบกว้างพบ 32 ชนิด วัชพืชใบแคบ 10 ชนิด และวัชพืชพวกกก 1 ชนิด

เอกสารอ้างอิง

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.
2. นิรนาม . 2547.คำแนะนำการป้องกันกำจัดวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช.กลุ่มวิจัยวัชพืช, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร< กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.133หน้า.
3. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัทอมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.
4. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัทอมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.
5. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการสมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.
6. Anonymous, 1982. Weed Surveying Technique. Paper in ASEAN Planti Advance Course on Weed Identification. 6-25 June 1982. ASEAN PLANTI Quarantine Centre and Training Institute, Malaysia. 20 pp.
7. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.
8. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.
9. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.
10. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.
11. http://mygir/121.exteen.com./20080908/entry-15

12. http://siweb.bss.go.th/qa/search-des cription.asp?QA-ID=196

13. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.

14. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.

15. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

ตารางที่ 1 ค่า Relative density (RD), Relative frequency (RF) และ Sum Dominance Ratio (SDR) ของวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันฝรั่ง

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
1	สาบแร้งสาบกา	*Ageratum conyzoides* L.	Asteraceae	B	12.8	10.2	11.5
2	หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa colona*(L.)Link.	Poaceae	N	15.7	4.1	9.9
3	หญ้ายาง	*Euphorbia heterophyllum*L.	Euphorbiaceae	B	10.8	8.1	9.4
4	หญ้าตีนกา	*Eleusine indica* (L.)Gaertn.	Poaceae	N	7.3	9.9	8.6
5	หญ้าตีนนก	*Digitaria adscendens*(L.)Scop	Poaceae	N	5.1	10.9	8.0
6	กระดุมใบใหญ่	*Borreria latifolia* (Aubl.)Schum.	Rubiaceae	B	5.7	5.8	5.8
7	หญ้าตีนติด	*Brachiaria reptans*(L.)Gard.& Hubb.	Poaceae	N	5.6	5.2	5.4
8	สะเดาดิน	*Hydrolea zeylanica* (L.)Valh.	Hydrophyllaceae	B	5.7	5.1	5.4
9	ผักขม	*Amaranthus viridis* L.	Amaranthaceae	B	4.4	4.8	4.6
10	ส้มกบดอกชมพู	*Oxalis latifolia* H.B.K.	Oxalidaceae	B	7.8	1.0	4.4
11	กระดุมขน	*Mitracarpus vilosus* (Sw.)DC.	Rubiaceae	B	7.7	1.0	4.4
12	แห้วหมู	*Cyperus rotundus*L.	Cyperaceae	S	4.3	4.3	4.3
13	ผักคราดหัวแหวน	*Synedrella nodiflora* (L.)Gaertn.	Asteraceae	B	2.8	4.6	3.7
14	หญ้างวงช้าง	*Helliotropium indicum* L.	Boraginaceae	B	2.3	3.0	2.7

1345

ตารางที่1(ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
15	หญ้าแพรก	*Cynodon dactylon*(L.)Pers.	Poaceae	N	1.2	3.6	2.4
16	หญ้าคออ่อน	*Crassocephalum crepidioides* (Benth.)S.Moore.	Asteraceae	B	1.7	2.8	2.3
17	กะเม็ง	Eclipta alba L.	Asteraceae	B	0.6	2.3	1.5
18	ผักเผ็ด	*Spiranthes paniculata* Wall. Ex DC.	Asteraceae	B	0.6	2.0	1.3
19	ผักเบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrum* L.	Aizoaceaee	B	0.5	2.0	1.3
20	เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia L.*	Sterculiaceae	B	0.3	2.0	1.2
21	กระดุมใบเล็ก	*Borreria laevis (Lamk.)Griseb.*	Rubiaceae	B	0.4	1.5	1.0
22	ผักกาดนา	*Blumea napifolia* DC.	Asteraceae	B	0.2	1.3	0.7
23	ผักปลาบ	*Commelina benghalensis* L.	Commelinaceae	B	0.1	1.3	0.7
24	หญ้าข้าวนก	*Echinochloa crus-gallli*(L.)Beauv.	Poaceae	N	0.2	1.0	0.6
25	ผักเบี้ยใหญ่	*Portulaca oleracea* L.	Portulacaceae	B	0.3	0.8	0.5
26	ผักขมฝรั่ง	*Chenopodium ficifolium* Smith.	Chenopodiaceae	B	0.2	0.8	0.5
27	ทหารกล้าขน	*Galinsoga ciliata* (Raf.)Blake.	Asteraceae	B	0.4	0.5	0.5
28	น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta* L.	Euphorbiaceae	B	0.1	0.8	0.4

1346

ตารางที่1(ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
29	ปีกนกไส้	*Biden pilosa* L.	Asteraceae	B	0.2	0.5	0.3
30	ทหารกล้า	*Galinsoga parviflora* Cav.	Asteraceae	B	0.2	0.5	0.3
31	ส้มกบ (ดอกชมพู)	*Oxalis latifolia H.B.K.*.	Oxalidaceae	B	0.2	0.5	0.3
32	โทงเทง	*Physalis minim*a L.	Solanaceae	B	0.1	0.5	0.3
33	ผักขมหนาม	*Amaranthus spinosus* L.	Amaranthaceae	B	0.0	0.5	0.3
34	ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus amarus* Schum.&Thonn.	Euphorbiaceae	B	0.0	0.5	0.3
35	ส้มกบ	*Oxalis corniculata* (L.).	Oxalidaceae	B	0.0	0.5	0.3
36	หญ้าขจรจบดอกเล็ก	*Pennisetum polystachyon*(L.)Schult.	*Poaceae*	N	0.0	0.5	0.3
37	ตดหมูตดหมา	*Paederia linearis* Hook. f.	Rubiaceae	B	0.0	0.3	0.1
38	บัวบก	*Centella asiatica* Urban	Umbeliferae	B	0.0	0.3	0.1
39	ไมยราบเลื้อย	*Mimosa invisa* Mart.	Mimosoideae	B	0.0	0.3	0.1
40	หญ้าโขย่ง	*Rottboellia exaltata* L.f.	Poaceae	N	0.0	0.3	0.1
41	หญ้าคา	*Imperata cylindrica* (L.)P.Beauv.	Poaceae	N	0.0	0.3	0.1

1347

ตารางที่1(ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
42	หญ้าปากควาย	*Dactylocthenium aegptium* (L.)B.P.	Poaceae	N	0.0	0.3	0.1
43	มะต่อมเสื้อ	*Sphaeranthus indicus* L.	Asteraceae	B	0.0	0.3	0.1

1 : B = วัชพืชประเภทใบกว้าง N = วัชพืชประเภทใบแคบ S = วัชพืชประเภทกก

2 : RD = Relative density

3 : RF = Relative frequency

4 : SDR = Sum Dominance Ratio

1348

สำรวจและรวบรวมวัชพืชในมันสำปะหลัง

Survey and Collection of Weed Species in Cassava.

จันทร์เพ็ญ ประคองวงศ์[1] จรัญญา ปิ่นสุภา[1] เบญจมาภรณ์ ลิ้มประเสริฐ[2]
มัตติกา ทองรส[3]
[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักการเกษตรอำเภอดำเนินสะดวก [3]สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6

บทคัดย่อ

การสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกมันสำปะหลัง ได้ดำเนินงานสำรวจในแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่ภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 ถึงเดือนสิงหาคม 2552 เป็นระยะเวลา 2 ปี พบวัชพืชทั้งหมด 32 วงศ์ (family) 80 สกุล (genuus) 103 พันธุ์ (species) ได้ประเมินจัดลำดับของวัชพืช โดยพิจารณาจาก ปริมาณและจำนวนครั้งในการสำรวจพบวัชพืชแต่ละชนิด และคำนวณค่า sum dominant ratio (SRD) สามารถจัด กลุ่มวัชพืชเด่น (dominant species) และ วัชพืชลำดับรอง (co-dominant species) ได้ดังนี้ คือ วัชพืชเด่นจากการสำรวจในครั้งนี้ได้แก่ หญ้าสาบ (*Chromolaena sp.*) มีค่า SDR 20.2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกลุ่มวัชพืชลำดับรอง พบ 8 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนนก (*Digitaria ciliaris* (Resz.) Koel). หญ้าแห้วหมู (*Cyperus rotundus* L.) แมงลักคา(*Hyptis sauveolens* Point.) กระดุมขน (*Mitracapus vilosus (SW.)DC.*) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium*(L.)P.B.) ตีนตุ๊กแก (*Tridax procumbens* L.) *หญ้าขน*(*Brachiaria reptans* (L.)Gard.&Hubb.) และ เทียนนา (*Ludwigia hyssopifolia* (G.don.) Excell.) มีค่า SDR 8.4, 7.2, 5.5, 3.8, 3.7, 3.5, 3.2, และ 3.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้อมูลจากการสำรวจในครั้งนี้ สามารถนำไปอ้างอิง และจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชตามหลักสากล เพื่อส่งให้กับประเทศคู่ค้าในการส่งออกผลผลิตตามมาตรการสุขอนามัย และสุขอนามัยพืช นอกจากนี้ยังใช้เป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูล และการจัดทำฐานข้อมูลเกี่ยวกับวัชพืชต่อไป

รหัสโครงการวิจัย 09 02 49 01

คำนำ

มันสำปะหลัง ชื่อทั่วไปภาษาอังกฤษเรียกว่า Cassava หรือ Tapioca มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* จัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ลำต้นมีลักษณะคล้ายข้อเนื่องจากปรากฏร่องรอยของก้านใบที่แก่ร่วงหล่นไปเป็นลักษณะคล้ายข้อ ก้านใบยาว แผ่นใบหยักเว้าเป็นแฉกมี 3-9 แฉก ดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กอยู่ที่ส่วนปลายของช่อดอก ส่วนดอกตัวเมียมีขนาดใหญ่กว่าอยู่ส่วนโคนของช่อดอก ดอกตัวเมียจะบานก่อนดอกตัวผู้ประมาณ 1สัปดาห์ ดังนั้นการผสมเกสรจึงเป็นการผสมข้ามต้น(http:/www.oae.go.th/AgroMag/WeeklyNews/listWeeklyMenu.php.)

หลังจากการปลูกมันสำปะหลังแล้วประมาณ 2 เดือน รากจะเริ่มสะสมแป้งและมีขนาดใหญ่ขึ้นตามอายุเรียกว่าหัว ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ดี มันสำปะหลังที่มีอายุมากกว่า 1 ปี บางพันธุ์อาจให้หัวน้ำหนักหลายสิบกิโลกรัม ส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลังมีกรดไฮโดรไซยานิค (HCN) ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อมนุษย์ และสัตว์ ใบและเปลือก มีสารนี้มากกว่าเนื้อสด เพราะมีกรดไฮโดรไซยานิคต่ำกว่า และก่อนจะบริโภคควรนำมันสำปะหลังมาปอกเปลือก หมัก เคี่ยว ย่างปิ้ง หรือต้ม กรดไฮโดรไซยานิคจะลดลงจนถึงปริมาณที่ร่างกายคนเราสามารถเปลี่ยนกรดไฮโดรไซยานิคเป็นสารอื่นที่ไม่เป็นอันตราย (http:/www.matichon.co.tk/ prahachat_detail.php?_ tag=02inv 8240950 &day=2007-09-24sionid=0203)

มันสำปะหลังเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นประเทศที่ผลิตมันสำปะหลังมากจึงเป็นประเทศที่อยู่ในบริเวณเส้นศูนย์สูตรระหว่างเส้นรุ้งที่ 20 องศาเหนือและใต้ ประเทศที่ปลูกมากได้แก่ บราซิล อินโดนีเซีย ไนจีเรีย ไทย และอินเดีย สำหรับประเทศไทยผลิตมันสำปะหลังได้มากเป็นอันดับ 5 ของโลก และสามารถปลูกได้ทั่วประเทศ แต่แหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ที่ภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัด ชลบุรี ระยอง ปราจีนบุรี นครราชสีมา และชัยภูมิ (http:/www.matichon.co.tk/prahachat_detail.php?_tag=02inv08240950&day=2007-09-24 sionid=0203)

มันสำปะหลังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดหวาน เป็นมันสำปะหลังที่ใช้เพื่อการบริโภค มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคต่ำ ไม่มีรสขม สามารถใช้หัวสดได้โดยตรง เช่นนำไปนึ่ง เชื่อม ทอด ซึ่งได้แก่มันสำปะหลังพันธุ์ห้านาที พันธุ์ระยอง 2 เป็นต้น อีกชนิดเป็นชนิดขม เป็นมันสำปะหลังที่มีรสขมไม่เหมาะสำหรับการบริโภคของมนุษย์หรือใช้หัวสดเลี้ยงสัตว์โดยตรง เนื่องจากมีปริมาณไฮโดรไซยานิคสูง มีความเป็นพิษต่อร่างกาย ต้องนำไปแปรรูปเป็นมันอัดเม็ด หรือมันเส้นจึงนำไปเลี้ยงสัตว์ได้ ซึ่งได้แก่พันธุ์ระยอง 1, พันธุระยอง 3, พันธุ์ระยอง 5, พันธุ์ระยอง 60, พันธุ์ระยอง 90 และเกษตรศาสตร์ 50 (http.//www.doa.go.th/pl_data/CASS/1ststst02.html)

ในประเทศไทยมีการใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารน้อยมาก ส่วนใหญ่ใช้แปรรูปทำแป้ง และแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ในรูปมันเส้น และมันอัดเม็ด สำหรับแป้งมันสำปะหลังนั้นมีการผลิตได้ประมาณปีละ 400,000 ตัน ส่งออกประมาณ 200,000 ตัน บริโภคภายในประเทศประมาณ 150,000- 200,000 ตัน สำหรับมันอัดเม็ดหรือมันเส้นนั้น มีสัดส่วน 70 % ของผลิตภัณฑ์ โดยมีมูลค่าส่งออกประมาณ 40 % ตลาดที่สำคัญได้แก่สหภาพยุโรปและจีน (http.//www.doa.go.th/pl_data/CASS/1stst/st02.html)

ปัจจุบันได้มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับมันสำปะหลังอย่างกว้างขวางทั้งเรื่องของการปรับปรุงพันธุ์ และการเขตกรรม แต่สำหรับการรายงานการสำรวจ และรวบรวมวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของประเทศนั้นมีน้อยมากและยังไม่มีรายงานการสำรวจตามมาตรฐานสากล อีกทั้งไม่ครอบคลุมพื้นที่ปลูกซึ่งเกษตรกรได้มีการขยายพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงได้ดำเนินการสำรวจวัชพืชในแหล่งปลูกมันสำปะหลังของประเทศเพื่อเป็นหลักฐานในการสืบค้นข้อมูลทางด้านวัชพืช และเป็นข้อมูลในการจัดทำบัญชีรายชื่อวัชพืช ส่งให้กับประเทศคู่ค้าในกรณีส่งออกส้มโอ ตามข้อตกลงมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ซึ่งจากการประชุมตกลงว่าด้วยภาษีศุลกากรและการค้า (General Agreement On Tariffs and Trade ; GATT) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2490 หลายรอบจนถึงรอบอุรุกวัย (Uruguay Round) เป็นรอบสุดท้ายที่ผ่านมา และได้มีการจัดตั้งองค์การค้าโลก (World Trade Organization : WTO) ในเดือนกรกฎาคม 2538 ที่ผ่านมา ความสำคัญข้อหนึ่งในข้อตกลงด้านการเกษตรของรอบอุรุกวัยคือการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures, SPS) ซึ่งหลักการของข้อตกลงนี้คือ ประเทศสมาชิก GATT หรือ WTO ในปัจจุบันมีสิทธิในการปกป้องสุขอนามัย และชีวิตของคน สัตว์ และพืช โดยอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์และพิสูจน์ได้ แต่ห้ามออกกฎระเบียบดังกล่าวให้เป็นอุปสรรคต่อการค้า ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีกรอบมาตรฐานให้สมาชิกถือปฏิบัติร่วมกันซึ่งกรอบมาตรฐานดังกล่าว องค์กรระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้องและประเทศสมาชิกของ GATT/WTO ส่วนใหญ่ก็เป็นสมาชิกอยู่ด้วยแล้ว ด้านสุขอนามัย (santitary) CODEX / WTO เป็นองค์กรที่รับผิดชอบในการออกมาตรฐาน (standard) แนวปฏิบัติ (guideline) และคำแนะนำ (Recommendation) ด้านสุขอนามัยพืชก็มีกรอบมาตรฐานของ IPPC (Internation Plant Protection Convention) ดังนั้นทุกประเทศสมาชิกสามารถออกกฎระเบียบภายใต้กฎหมายของแต่ละประเทศได้ แต่ต้องไม่เกินกรอบมาตรฐานองค์กรที่เกี่ยวข้อง ปัจจุบัน IPPC ได้ออกมาตรฐานด้านสุขอนามัยพืชมาแล้ว 29 มาตรฐานคือ International Standard for Phytosanitary Measures, ISPM no.1 – no.29 ในบรรดามาตรฐานทั้งหมดมีอยู่บางมาตรฐานที่แสดงถึงความสำคัญในการจัดทำบัญชีรายชื่อศัตรูพืช และการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช คือ มาตรฐานที่ 2 14 19 และ 21 (https://www.ippc.int/IPP/En/default.jsp) แต่กฎเกณฑ์ภายใต้การตกลงว่าด้วย

การบังคับใช้สุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ระบุชัดเจนว่าประเทศสมาชิกมีสิทธิและพันธกรณีพื้นฐาน (right and obligation) ในการกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชจากต่างประเทศมิให้เข้าไปเป็นอันตราย หรือเกิดความเสียหายต่อสุขภาพมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม วิธีการปฏิบัติคือประเทศผู้นำเข้าสินค้าต้องมีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยวิธีวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืช (Pest Risk Analysis : PRA) ซึ่งอาจเป็นโรคพืช แมลง ไร สัตว์ ศัตรูพืช หรือวัชพืช ชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจติดมากับสินค้าเกษตรที่นำเข้า การวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชของประเทศผู้นำเข้าจะดำเนินการได้ต้องมีการร้องขอบัญชีรายชื่อศัตรูพืช และข้อมูลด้านศัตรูพืชแต่ละชนิดของสินค้าเกษตรนั้น ๆ ซึ่งประเทศผู้ส่งออกสินค้าเกษตรจะต้องเป็นผู้จัดส่งบัญชีรายชื่อศัตรูพืช (Pest List : PL) รวมทั้งข้อมูลและขั้นตอนในการผลิตประกอบการขอเปิดตลาด (market access) หากประเทศผู้ส่งออกไม่มีบัญชีรายชื่อศัตรูพืชที่พร้อมครบถ้วนตามความต้องการของผู้นำเข้า ก็จะทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชได้ และไม่ได้รับอนุญาตให้นำเข้าสินค้าเกษตรนั้น ๆ ทำเกิดการกีดกันทางการค้า ดังนั้นจึงควรจัดเตรียมบัญชีรายชื่อของพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ ที่มีศักยภาพในการส่งออกเพิ่มเป็นการสร้างรายได้ให้กับประเทศ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- แปลงสุ่ม (Sample Plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร
- เลนส์ขยาย และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องตา
- กล้องบันทึกภาพ
- วัสดุ และอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเช่น กรรไกร ถุงพลาสติก เฟรมอัดตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์/กระดาษฟาง กระดาษลูกฟูก และเชือกหรือสายรัด
- อุปกรณ์ในการบันทึกข้อมูล เช่น กระดาษ หรือแบบฟอร์มในการบันทึกข้อมูล
- เอกสารและตำราประกอบการจำแนกและระบุชื่อพืช

วิธีการ

1. การค้นคว้า และรวบรวมข้อมูลวิชาการ

ค้นคว้าเอกสารวิชาการต่าง ๆ เกี่ยวกับมันสำปะหลัง เช่น ชนิดและพันธุ์ของมันสำปะหลัง ทางการค้า การปลูกและดูแลรักษาด้านอารักขาพืช และการแพร่ระบาดของวัชพืช เป็นต้น

2. การสำรวจ และรวบรวมชนิดวัชพืช

แผนการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกมันสำปะหลังโดยแบ่งเขตสำรวจตามภาคต่าง ๆ ซึ่งได้แบ่งตามที่ได้กำหนดในอักขรานุกรมภูมิศาสตร์ไทยของราชบัณฑิตสภา บัณฑิตสภา เล่มที่ 1 ปี 2525 หน้า 3-18 (http/www.thaihomaster.com/showinformation.php? TYPE=I&ID=464) คือ

ภาคเหนือ : จังหวัดอุตรดิต ที่อำเภอ ทองแสนขัน และอำเภอพิชัย **ภาคตะวันตก** : จังหวัดตากที่อำเภอพบพระ และอำเภอวังเจ้า จังหวัดกาญจนบุรี ที่อำเภอเมือง อำเภอด่านมะขามเตี้ย อำเภอไทรโยค และอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดเพชรบุรี ที่อำเภอชะอำ จังหวัดราชบุรีมี่อำเภอเมือง อำเภอจอมบึง และอำเภอสวนผึ้ง **ภาคกลาง** : จังหวัดพิษณุโลกที่อำเภอพรหมพิราม และ อำเภอบ้านไร่ จังหวัดกำแพงเพชรที่อำเภอโกสัมพีนคร และอำเภอเมือง จังหวัดอุทัยธานีที่อำเภอบ้านไร่ และอำเภอลานสัก จังหวัดชัยนาทที่อำเภอเนินขาม และจังหวัดสุพรรณบุรีที่อำเภอด่านช้าง **ภาคตะวันออก** : จังหวัดปราจีนบุรี ที่อำเภอประจันตคาม อำเภอกบินทร์บุรี และอำเภอเมือง จังหวัดสระแก้วที่อำเภอเมือง อำเภอวัฒนานคร อำเภอคลองหาด อำเภอวังสมบูรณ์ อำเภอวังน้ำเย็น อำเภอท่าตะเกียบ จังหวัดฉะเชิงเทราที่อำเภอสนามชัยเขต อำเภอพนมสารคาม และอำเภอ เขาหินซ้อน จังหวัดชลบุรีที่อำเภอบางละมุง และอำเภอศรีราชา จังหวัดระยองที่อำเภอแกลง อำเภอวังจันทร์ และอำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรีที่อำเภอนายายอาม อำเภอแก่งหางแมว อำเภอสอยดาว และอำเภอท่าใหม่ และจังหวัดตราดที่อำเภอเขาสมิง และ**ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ** : จังหวัดนครราชสีมาที่อำเภอปากช่อง อำเภอสูงเนิน อำเภอปักธงชัย อำเภอหนองบุญมาก อำเภอจักราช อำเภอห้วยแถลง อำเภอวังน้ำเขียว และอำเภอด่านขุนทด จังหวัดบุรีรัมย์ที่อำเภอกระสัง อำเภอลำปลายมาศ จังหวัดศรีสะเกษ ที่อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดอุบลราชธานีที่อำเภอสว่างวีระวงศ์ อำเภอพิบูลย์มังสาหาร อำเภอ โขงเจียม อำเภอสิรินธร อำเภอบุญฑริก และอำเภอเดชอุดม จังหวัดยโสธรที่อำเภอเลิงนกยาง และอำเภอกุดชุม จังหวัดชัยภูมิที่อำเภอเมือง และอำเภอจัตุรัส จังหวัดมหาสารคามที่อำเภอบรบือ จังหวัดขอนแก่นที่อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดมุกดาหารที่อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม ที่อำเภอธาตุพนม และอำเภอท่าอุเทน จังหวัดเลยที่อำเภอหนองหัน อำเภอเชียงคาน อำเภอเมือง และอำเภอปากชม และ จังหวัดหนองคายที่อำเภอสังคม

วิธีสุ่มตัวอย่างวัชพืชในการสำรวจนั้นใช้แปลงสุ่ม (sample plot) ขนาด 0.5 x 0.5 เมตร วางแปลงสุ่มโดยวิธี Unrestricted sampling method (Anonymous, 1982) ทำการสุ่ม 4 จุดต่อหนึ่งแปลง บันทึกจำนวนชนิด นับปริมาณวัชพืชแต่ละชนิด และหาชื่อวัชพืช บันทึกภาพ เก็บตัวอย่างวัชพืชที่สมบูรณ์ คือมีส่วนของราก ต้น ใบ และดอก อัดไว้ในแผงไม้ เพื่อนำมาตากแห้ง รวมถึงการเก็บเมล็ดที่สมบูรณ์ และเก็บรักษาไว้ที่ห้องเก็บตัวอย่างพรรณไม้ เพื่อใช้ในการศึกษาและเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลต่อไป ส่วนการวิเคราะห์ลักษณะเชิงปริมาณ (Quantitative characteristic) ของวัชพืชที่สำรวจพบในแปลงเพื่อจัดลำดับวัชพืชเด่น (dominant species) และวัชพืชรอง (co-dominant species) นั้นได้อาศัยค่าของ sum dominance ratio ซึ่งคำนวณได้จากค่า relative density และค่า relative frequency จากสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Relative density (RD)} = \frac{\text{Density for a species x 100}}{\text{Total density for all species}}$$

$$\text{Relative frequency (RF)} = \frac{\text{Frequency value for a species} \times 100}{\text{Total frequency value for all species}}$$

$$\text{Sum dominant ratio (SDR)} = \frac{\text{RD} + \text{RF}}{2}$$

การจำแนกวัชพืช (classification) และการระบุชื่อวิทยาศาสตร์ (identification) นั้นได้อาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของนักวิชาการและเอกสารวิชาการดังต่อไปนี้

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.

2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.

3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.

4. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.

5. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.

6. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.

7. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.

8. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.

9. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.

10. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.

11. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาในการดำเนินงาน ตั้งแต่สืบค้นข้อมูล วางแผนการสำรวจ และสำรวจวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง และรวบรวมตัวอย่างวัชพืช ได้ดำเนินการตั้งแต่เดือนมกราคม 2551 ถึงเดือน สิงหาคม 2552

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

มันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย ขายคล่อง มีราคาดี และมีโรคแมลงศัตรูน้อย นอกจากนี้ยังมีลักษณะเด่นอีกหลายอย่างคือ สามารถขึ้นได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ และยังเป็นพืชทนแล้งได้ดี หลังจากมันสำปะหลังตั้งตัวแล้ว แม้จะไม่มีฝนตกต่ำติดต่อกันระยะยาวนานเป็นเดือนมันสำปะหลังก็ไม่ตาย พอได้ฝนก็จะใช้แป้งที่หัวมาสร้างยอดและไปเจริญเติบโตต่อไป ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นกสิกรในประเทศไทยจึงนิยมปลูก ประกอบกับปัจจุบันมันสำปะหลังเป็นหนึ่งในพืชพลังงานที่นำมาเป็นวัสดุในการผลิตเอทานอล ทำให้กสิกรนิยมปลูกมันสำปะหลังอย่างแพร่หลายเพิ่มมากขึ้น จึงพบว่ากสิกรได้ปลูกมันสำปะหลังในพื้นที่ลุ่ม และที่ว่างเปล่าทั่วๆไป

พันธุ์มันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทยมีอยู่ 3 พันธุ์คือ พันธุ์ที่ใช้หัวเป็นอาหาร เรียกว่าพันธุ์ห้านาที มีกรดไฮโดรไซยานิก ในหัวต่ำ เมื่อต้มแล้วเนื้อจะซุย นุ่มไม่ขม สังเกตได้ที่ก้านใบมีสีแดงเข้ม พันธุ์ที่ใช้หัวในอุตสาหกรรม พันธุ์นี้ปลูกเป็นจำนวนมากนับล้าน ๆ ไร่ เป็นพันธุ์ที่มีปริมาณแป้งในหัวมาก และมีกรดไฮโดรไซยานิกสูง ก้านใบมีสีเขียวอ่อนปนแดง และอีกพันธุ์ใช้เป็นไม้ประดับเรียกมันด่าง

การปลูกมันสำปะหลังนั้น กสิกรจะใช้ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังโดยใช้ลำต้นมันสำปะหลังตัดเป็นท่อนยาวประมาณ 25 เซนติเมตร เลือกใช้ท่อนพันธุ์จากส่วนกลาง และส่วนโคนของลำต้นและส่วนโคนของลำต้น ระยะปลูกใช้ระยะระหว่างแถว 1 เมตร ระยะระหว่างต้น 0.7 – 1 เมตร โดยใช้ท่อนพันธุ์ปักลงไปบนดินโดยปักเอียงประมาณ 45 องศา

ฤดูปลูกมันสำปะหลังในบ้านเรา สามารถปลูกได้ตลอดปี กสิกรในแถบจังหวัดชลบุรี ระยอง และนครราชสีมา ปลุกมันสำปะหลังตลอดปี แต่จังหวัดอื่น ๆ ปลูกมากในเดือนเมษายน และพฤษภาคม ตามผลการทดลองของกรมวิชาการเกษตร พบว่าการปลูกมันสำปะหลังในเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคมจะให้ผลผลิตสูง (http://kanchanapisek.on.th/kp6/BOOK5/chapter4/t5-4-12,htm#sect4)

วัชพืชเป็นปัญหาหนึ่งที่จะทำให้ผลผลิตของมันสำปะหลังลดลงได้ 20 – 90 เปอร์เซ็นต์ และระยะที่วัชพืชจะรบกวนมากที่สุดคือระยะที่มันยังเล็กอายุประมาณ 1-2 เดือน มีรายงานวัชพืชที่สำคัญได้แก่ หญ้าขจรจบดอกเล็ก หญ้าขจรจบดอกใหญ่ หญ้าตีนติด หญ้าตีนกา หญ้าตีนนก หญ้า

ปากควาย หญ้านกสีชมพู หญ้าแพรก หญ้ายาง ผักโขมหิน ผักเบี้ยหิน เถาจิงจ้อ และ หญ้าแห้วหมู (นิรนาม, 2547)

การสำรวจวัชพืชในมันสำปะหลังครั้งนี้ได้เลือกแปลงปลูกที่มันสำปะหลังอายุต่าง ๆ เช่น ตั้งแต่เริ่มปลูกท่อนพันธุ์อายุประมาณ 1-2 เดือน และช่วงที่มันสำปะหลังโตคลุมพื้นที่อายุประมาณ 4-5 เดือน รวมถึงระยะก่อนเก็บเกี่ยวคือ 6-12 เดือน

วัชพืชที่สำรวจพบในแปลงมันสำปะหลังนั้นมีความแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่ตามฤดูกาล ขนาดของต้นและการดูแลจัดการของกสิกรเจ้าของแปลง กล่าวคือในฤดูแล้งจะพบวัชพืชน้อยมากทั้งชนิดและปริมาณ นอกจากนี้ขนาดและอายุของต้นมันสำปะหลังก็มีผลต่อชนิดและปริมาณวัชพืชเช่นกันคือแปลงที่ต้นมันสำปะหลังเจริญเติบโตและมีร่มเงาคลุมพื้นที่ โดยเฉพาะแปลงที่กสิกรมีการดูแลจัดการวัชพืชสม่ำเสมอจะพบวัชพืชน้อยมากบางแปลงอาจไม่พบวัชพืชเลย แต่ตรงกันข้ามแปลงที่กสิกรไม่ได้จัดการวัชพืชหรือมีการดูแลจัดการที่ดีวัชพืชจะขึ้นรกมาก

จากการสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกมันสำปะหลังตามพื้นที่ที่ได้กำหนดในแผนดังกล่าวข้างต้น พบวัชพืชทั้งหมด 103 ชนิด สามารถจำแนกได้ 32 วงศ์ (family) 80 สกุล (genus) และ 103 พันธุ์ (species) ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยหาค่า RD RF และ SDR ของวัชพืชแต่ละชนิด เพื่อนำมาเป็นตัวกำหนดในการจัดแบ่งกลุ่มวัชพืชตามปริมาณ และความถี่ที่พบวัชพืชแต่ละชนิดในแปลงสำรวจ เพื่อให้เห็นรายละเอียดของการกระจายตัวและปริมาณของวัชพืชรายชนิดในแปลงปลูกมันสำปะหลัง และจากข้อมูลตามตารางที่ 1 สามารถแบ่งกลุ่มวัชพืชได้ 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มวัชพืชเด่นในการสำรวจครั้งนี้พบเพียง 1 ชนิด หรือ พันธุ์(species) คือ หญ้าสาบ มีค่า SDR สูงสุด คือ 20.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าวัชพืชในลำดับรองมาก ทั้งนี้เนื่องจาก หญ้าสาบสามารถเจริญเติบโตได้ตลอดปี ผลิตเมล็ดได้จำนวนมาก และเมล็ดงอกได้ดี ดังนั้นบางจุดสำรวจจึงพบต้นอ่อนของหญ้าสาบจำนวนมากกว่าร้อยต้นต่อแปลงสำรวจ

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มวัชพืชที่พบในลำดับรองพบวัชพืช 8 ชนิด/พันธุ์ (species) ได้แก่ หญ้าตีนนก หญ้าแห้วหมู แมงลักคา กระดุมขน หญ้าปากควาย ตีนตุ๊กแก หญ้าขน และ เทียนนา มีค่า SDR 8.4, 7.2, 5.5, 3.8, 3.7, 3.5, 3.2, และ 3.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วัชพืชในกลุ่มนี้จัดเป็นวัชพืชสามัญที่พบเห็นทั่วไป

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มวัชพืชที่พบระดับปานกลาง มีจำนวนชนิดวัชพืชจากการสำรวจมากกว่าวัชพืชในกลุ่มที่ 2คือพบทั้งหมด 14 ชนิด/พันธุ์ ได้แก่ โสนดอน ลูกใต้ใบ หญ้ายาง ไมยราบ สาบแร้งสาบกา กระดุมใบใหญ่ หนวดปลาดุก สร้อยนกเขา หญ้านกสีชมพู กระต่ายจาม สาบเสือ หญ้าไข่เหา ตดหมูตดหมา หญ้าท่าพระ มีค่า SDR 1.0 – 2.6 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มวัชพืชที่พบระดับน้อย เป็นกลุ่มวัชพืชที่พบปริมาณน้อย และไม่พบบ่อยครั้งจากการสำรวจ พบว่าวัชพืชในกลุ่มนี้มีจำนวนชนิดวัชพืชมากที่สุดคือ 80 ชนิด/พันธุ์ ที่มีค่า

SDRต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ปอวัชพืช ถั่วลิสงนา หญ้าตีนกา หญ้าละออง น้ำนมราชสีห์ หญ้าชันกาด หญ้ากาบหอย ไมยราบเลื้อย สะอึก หญ้านมหนอน ผักแครด พันงูเขียว หญ้าแพรก ผักปลาบนา หญ้าหนวดแมว (กก) ต้อยติ่ง ผักขม หญ้าขจรจบดอกเล็ก ครอบฟันสี ผักเบี้ยใหญ่ ขยุ้มตีนหมา หญ้าคา กินกุ้งน้อย กระดุมใบเล็ก กกดอกตุ้ม หญ้าไม้กวาด ผักเสี้ยนผี กระถินทุ่ง ผักขมหนาม หญ้าขจรจบดอกเหลือง เงี่ยงปา ผักเสี้ยน (ดอกชมพู) กะทกรก พะดอเงียว กกทราย หนาดเหลี่ยม หญ้าดอกชมพู หญ้าหวาย ถั่วผี ผักขมหิน หญ้านิ้วหนู หญ้าดอกขาว หญ้ากำมะหยี่ ส้มกบ กกสามเหลี่ยม กะเม็ง หญ้าขน ผักบุ้ง ผักปลาบ มะหิ่งเม่น หญ้าคออ่อน เฟิน ห้วยชินสีห์ หญ้าไม้กวาดใบใหญ่ หนาดน้อย (ดอกเหลือง) หญ้าเจ้าชู้ ตำแย โคกกระสุน ผักเสี้ยน(ดอกขาว) กกสามเหลี่ยมใหญ่ โทงเทง ผักปลาบ กกสามเหลี่ยมเล็ก ค้อนกลอง กก จ้อล่อ จิงจ้อ ผักเบี้ยหิน หญ้าตอแหล หญ้าไผ่ หญ้ารังนก กินกุ้งหลวง ทหารกล้า ทหารกล้าขน บานเที่ยง หญ้าขจรจบดอกใหญ่ และหญ้าสะกาดน้ำเค็ม มีค่า SDR ต่ำกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์

วัชพืชที่สำรวจพบในแปลงมันสำปะหลังดังกล่าวข้างต้นสามารถจัดแบ่งออกตามลักษณะและขนาดของใบเพื่อความเหมาะสมในการเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชให้มีประสิทธิภาพคือ แบ่งเป็นวัชพืชใบกว้าง (B) 68 ชนิด เป็นวัชพืชที่มีขนาดของใบกว้างและรูปร่างของใบหลายแบบ เช่น รูปไข่ และรูปทรงกลม เป็นต้น ประกอบด้วยวัชพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ต่าง ๆ คือ Asteraceae Laminaceae Rubiaceae Onagraceae Papilionaceae Euphorbiaceae Mimosoideae Aizoaceae Scrophulariaceae
Tiliaceae Convolvulaceae Verbenaceae Commelinaceae Acanthaceae Malvaceae Portulacaceae
Capparidaceae Xyridaceae Passifloraceae Sterculiaceae Nyctaginaceae Oxalidaceae Lythraceae
Urticaceae Zygophyllaceae และ Solanaceae และเป็นวัชพืชวัชพืชใบแคบ(N) ที่มีขนาดของใบแคบเรียวยาวมีส่วนของใบและกาบใบ มีข้อและปล้อง การเรียงของใบเป็น 2 แถว มีจำนวน 25 ชนิด จัดอยู่ในวงศ์ Poaceae ทั้งหมด และวัชพืชพวกกก (S) เป็นวัชพืชที่มีขนาดของใบแคบเรียวยาวคล้ายพวกใบแคบ แต่ไม่มีข้อและปล้อง มีการเรียงของใบเป็น 3 แถว จัดอยู่ในวงศ์ Cyperaceae ทั้งหมดเช่นกัน มีจำนวน 10 ชนิด และเฟิน (F) 1 ชนิด (ตารางที่ 1)

จากการสำรวจสามารถสรุปวัชพืชในพื้นที่หรือแปลงปลูกมันสำปะหลังแยกตามภาคต่าง ๆ ได้ดังนี้

ภาคเหนือ : มีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับภาคอื่น ๆ ได้ทำการสำรวจวัชพืชในแปลงมันสำปะหลังเพียงจังหวัดเดียวคือ จังหวัดอุตรดิต พบวัชพืชทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ หญ้าตีนนก หญ้าปากควาย สร้อยนกเขา สาบเสือ แมงลักคา ลูกใต้ใบ และหญ้าสาบ

ภาคตะวันตก : มีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในหลายจังหวัด จากการสำรวจวัชพืชในพื้นที่ดังกล่าว พบวัชพืช 56 ชนิด ได้แก่ กกทราย กระดุมขน กระดุมใบใหญ่ กระทกรก กะเม็ง หญ้าขจรจบดอกเล็ก ขยุ้มตีนหมา ครอบฟันสี โคกกระสุน เงี่ยงปา ตดหมูตดหมา ตีนตุ๊กแก ถั่วผี เทียนนา น้ำนมราชสีห์ ปอวัชพืช ผักขมหนาม ผักขมหิน ผักแครด ผักเบี้ยหิน ผักเบี้ยใหญ่ ผักปลาบ ผักปลาบ พะดอเงียว ฟันงูเขียว แมงลักคา ไมยราบเลื้อย ลูกใต้ใบ สร้อยนกเขา สะอึก สาบแร้งสาบกา สาบเสือ โสนดอน หญ้ากำมะหยี่ หญ้าขน หญ้าคออ่อน หญ้าดอกขาว หญ้าดอกชมพู หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก หญ้าตีนกา หญ้าท่าพระ หญ้านกสีชมพู หญ้านมหนอน หญ้าปากควาย หญ้าแพรก หญ้ายาง หญ้าสาบ หญ้าหนวดปลา หญ้าหวาย หนวดปลาดุก หนาดน้อย หนาดเหลี่ยม แห้วหมู ทหารกล้า และ *Galingsoga parviflora* .

ภาคกลาง : มีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังในหลายจังหวัดเช่นกัน ได้ทำการสำรวจพบวัชพืชในแปลงปลูกมันสำปะหลังทั้งหมด 33 ชนิด คือ กระดุมขน กระต่ายจาม หญ้าขจรจบดอกเหลือง เงี่ยงปา เซ่งใบมน ตดหมูตดหมา ตีนตุ๊กแก ถั่วผี ถั่วลิสงนา เทียนนา น้ำนมราชสีห์ ผักปลาบนา แมงลักคา ไมยราบเลื้อย ลูกใต้ใบ สร้อยนกเขา สะอึก สาบแร้งสาบกา สาบเสือ โสนดอน หญ้าไข่เหา หญ้าคา หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก หญ้านมหนอน หญ้าไผ่ หญ้าปากควาย หญ้ายาง หญ้าสาบ แห้วหมู และ *Conyza sumatrensis*

ภาคตะวันออก : จัดเป็นภาคหนึ่งที่มีการปลูกมันสำปะหลังอย่างแพร่หลายและจากการสำรวจวัชพืชจึงพบว่ามีวัชพืชมากถึง 69 ชนิด ได้แก่ กกดอกตุ้ม กกทราย กกสามเหลี่ยม กินกุ้งน้อย กินกุ้งหลวง กระดุมขน กระดุมใบเล็ก กระดุมใบใหญ่ กระต่ายจาม กระถิ่นทุ่ง หญ้าขจรจบดอกเล็ก หญ้าขจรจบดอกใหญ่ หญ้าขจรจบดอกเหลือง ค้อนกลอง ครอบฟันสี เงี่ยงปา จิงจ้อ ขยุ้มตีนหมา เซ่งใบมน ตดหมูตดหมา ต้อยติ่ง ตีนตุ๊กแก ถั่วลิสงนา ถั่วผี เทียนนา น้ำนมราชสีห์ ปอวัชพืช ผักขม ผักขมหิน ผักแครด ผักบุ้ง ผักปลาบ ผักปลาบ ผักเสี้ยน(ดอกชมพู) ผักเสี้ยนผี เฟิน *(Lygodium* sp) มะหิ่งแม่น แมงลักคา ไมยราบ ไมยราบเครือ ลูกใต้ใบ สร้อยนกเขา สะอึก สาบแร้งสาบกา สาบเสือ โสนดอน ห้วยชินสีห์ หญ้ากาบหอย หญ้าไข่เห่า หญ้าโขย่ง หญ้าคา หญ้าชันกาด หญ้าดอกขาว หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก หญ้านกสีชมพู หญ้านมหนอน หญ้าฟันหนู หญ้าปากควาย หญ้าแพรก หญ้าไม้กวาด หญ้ายาง หญ้าละออง หญ้าสาบ หญ้าหนวดแมว หนวดปลาดุก แห้วหมู และ *Panicum maximum*

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : เป็นภาคที่มีการปลูกมันสำปะหลังมากที่สุดในปีพ.ศ. 2552 มีพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังมากถึง 7.7 พันไร่ (http:/as.doa.go.th/fieldcrops/cas/oth/001.pdf) จากการสำรวจวัชพืชในแปลงมันสำปะหลังพบวัชพืชทั้งหมด 76 ชนิด ได้แก่ กก กกดอกตุ้ม กกสามเหลี่ยมเล็ก กกสามเหลี่ยมใหญ่ กระดุมขน กระดุมใบเล็ก กระดุมใบใหญ่ กระต่ายจาม กะทกรก กะเม็ง กินกุ้งน้อย หญ้าขจรจบดอกใหญ่ หญ้าขจรจบดอกเล็ก หญ้าขจรจบดอกเหลือง

ขยุ้มตีนหมา ครอบฟันสี เงี่ยงป่า หญ้าสะกาดน้ำเค็ม เซ่งใบยาว ตำแย ตีนตุ๊กแก ถั่วลิสงนา เทียนนา โทงเทง น้ำนมราชสีห์ ปอกระเจา ปอวัชพืช ผักขม ผักขมหนาม ผักแครด ผักเบี้ยใหญ่ ผักปลาบน ผักปลาบ ผักเสี้ยนผี ฟันงูเขียว พะคอเงียว แมงลักคา มะหิ่งเม้น ไมยราบ ไมยราบเครือ ลูกใต้ใบ ส้มกบ สร้อยนกเขา สาบแร้งสาบกา สาบเสือ สะอึก โสนดอน หญ้ากาบหอย หญ้าไข่เหา หญ้าโขย่ง หญ้าคา หญ้าเจ้าชู้ หญ้าชันกาด หญ้าดอกชมพู หญ้าตอแหล หญ้าตีนกา หญ้าตีนติด หญ้าตีนนก หญ้าท่าพระ หญ้านกสีชมพู หญ้านมหนอน หญ้าปากควาย หญ้าแพรก หญ้ามาเลเซีย หญ้าไม้กวาด หญ้ายาง หญ้ารังนก หญ้าละออง หญ้าสาบ หญ้าหนวดแมว (กก) หญ้าหวาย หนวดปลาดุก แห้วหมู หญ้าลิ้นงู *Conyza sumatrensis* และ*Cyanotis axillaris*

จากการจัดลำดับวัชพืช และสรุปได้ว่าพบวัชพืชเด่น 1 ชนิด และวัชพืชลำดับรอง 8 ชนิด ตามที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น แสดงให้เห็นว่าวัชพืชในกลุ่มวัชพืชเด่นและวัชพืชรองทั้ง 9 ชนิด ดังกล่าว เป็นวัชพืชที่พบในปริมาณมากคือมีความหนาแน่นของจำนวนต้นต่อตารางเมตรสูง นอกจากนี้ยังสำรวจพบบ่อยครั้ง หรือมีความถี่ในการสำรวจพบสูงกว่าวัชพืชชนิดอื่น ๆ จึงจัดเป็นกลุ่มวัชพืชที่เป็นปัญหาและระบาดรุนแรงมากกว่าวัชพืชอื่น ๆ ในกลุ่มที่สำรวจพบ

ข้อมูลจากการสำรวจวัชพืชในพื้นที่หรือแปลงปลูกมันสำปะหลังในครั้งนี้สามารถนำไปจัดทำเป็นบัญชีรายชื่อวัชพืชในมันสำปะหลังเพื่อเตรียมเสนอต่อประเทศคู่ค้าในกรณีที่มีการร้องขอ หรือมีการเปิดตลาดระหว่างประเทศแหล่งใหม่ นอกจากข้อมูลรายชื่อวัชพืชที่ได้จากการสำรวจแล้ว ยังได้ตัวอย่างต้นวัชพืชเพื่อจัดทำเป็นตัวอย่างพรรณไม้แห้ง และได้รวบรวมเมล็ดวัชพืชที่สมบูรณ์นำมาตากแห้งบรรจุไว้ในขวดแก้ว และบันทึกข้อมูลต่าง ๆ เช่น ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อท้องถิ่น สถานที่และวันเวลาที่ทำการเก็บเมล็ดติดไว้ที่ข้างขวด ตามมาตรฐานสากล เพื่อใช้สำหรับเทียบเคียงหาชื่อเมล็ดในกรณีที่มีเมล็ดปนเปื้อนมากับสินค้าการเกษตร ทั้งผลผลิตการเกษตรที่นำเข้าและส่งออก รวมถึงสินค้าอุตสาหกรรม ดังเช่นกรณีรถยนต์ที่มีเมล็ดวัชพืชติดกับตัวถังและล้อรถยนต์ที่ส่งออกไปยังประเทศออสเตรเลีย หรือเมล็ดที่พบในกระเพาะของนก เป็นต้น

สรุปผลการศึกษาและคำแนะนำ

1. การสำรวจวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังตามภาคต่าง ๆ คือ ภาคเหนือ ภาคตะวันตก ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบวัชพืชทั้งหมด 103 ชนิด (species) จัดจำแนกได้ 32 วงศ์ (family) 80 สกุล (genus) สามารถเป็นข้อมูลในการจัดทำบัญชีรายชื่อวัชพืชที่เป็นปัจจุบันตามหลักสากล เพื่อจัดส่งให้ประเทศคู่ค้าในการส่งออกมันสำปะหลัง หรือในกรณีที่ขอเปิดตลาดใหม่

2. วัชพืชเด่นจากการสำรวจในครั้งนี้ มี 1 ชนิด คือหญ้าสาบ วัชพืชลำดับรองมี 8 ชนิด คือ หญ้าตีนนก หญ้าแห้วหมู, แมงลักคา กระดุมขน หญ้าปากควาย ตีนตุ๊กแก หญ้าขน และ เทียนนา
3. จากการสำรวจวัชพืชในครั้งนี้จำแนกเป็นวัชพืชใบกว้างได้ 68 ชนิด วัชพืชใบแคบ 25 ชนิด วัชพืชกก 10 ชนิด และเฟิน 1 ชนิด การจำแนกวัชพืชตามรูปร่างและลักษณะของใบนั้น จะเป็นประโยชน์ต่อการเลือกใช้สารกำจัดวัชพืชให้มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชบางชนิด มีคุณสมบัติกำจัดวัชพืชแตกต่างกัน เช่น สารกำจัดวัชพืชบางชนิดจะเลือกทำลายเฉพาะพืชใบกว้าง บางชนิดเลือกทำลายเฉพาะพืชใบแคบเป็นต้น
4. ได้ภาพวัชพืชเพื่อเตรียมจัดพิมพ์เป็นคู่มือการจำแนกวัชพืช
5. ได้เมล็ดวัชพืชเพื่อใช้เป็นหลักฐานในการเทียบเคียงหาชื่อชนิดวัชพืช และใช้ในงานวิจัยด้านวัชพืชต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. นิรนาม. 2545. วัชพืชสามัญภาคกลาง. สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่พับลิชชิ่ง กรุงเทพมหานคร, 10900. 135 หน้า.
2. ปัทมา แซ่ลิ้ม และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2543. ดอกหญ้า เล่ม 1. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 95 หน้า.
3. ปัทมา แซ่ลี้ และ อภิรักษ์ สุขสัย. 2544. ดอกหญ้า เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร. บริษัท อมรินทร์ พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด. 94 หน้า.
4. อำไพ ยงบุญเกิด สกล สุธีสร และ จเร สดากร. วัชพืชในสวนยางพารา. เอกสารวิชาการ สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย หมายเลข 3. 171 หน้า.
5. Anonymous. 1997. Weeds in the Tropics. Sanbi Printing Co.Ltd.Tokyo. Japan. 304 pp.
6. Haffiger. E. and H. Scholz. 1980. Grass Weeds 1. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 142 pp.
7. Haffiger. E. and H. Scholz. 1981. Grass Weeds 2. CIBA – GEIGY Ltd., Basle, Swizerland. 137pp.
8. Haselwood, E.L., G.G. Motter and R.T. Hirano. 1983. Handbook of Hawiian Weeds. 2nd Ed. Honolulu : Harold L. Lyon Aboretum. 490 pp.
9. http:/www.oae.go.th/AgroMag/ WeeklyNews/listWeeklyMenu.php.
10. http:/www.matichon.co.tk/ prahachat_detail.php?_ tag=02inv8240950 &day=2007-09-24sionid=0203
11. http.//www.doa.go.th/pl_data/CASS/1stst/st02.html

12. https://www.ippc.int/IPP/En/default.jsp
13. http/www.thaihomaster.com/showinformation.php? TYPE=I&ID=464
14. http://kanchanapisek.on.th/kp6/BOOK5/chapter4/t5-4-12,htm#sect4
15. http:/as.doa.go.th/fieldcrops/cas/oth/001.pdf
16. Moody, K.,C.E. Munroe, R.T. Lubigan and E.C. Paller, Jr. 1984. Major Weeds of Philippines. Laguna : Weed Science Society of the Philippines. 328 pp.
17. Noda. K. M. Teerawatsakul. C. Prakongvongs and L. Chaiwiratnukul. 1994. Major Weeds in Thailand. Mass Medias Co. Ltd. Bangkok. Thailand. 164 pp.
18. R. Tavatchai and J.F. Maxwell. 1994. Weeds of Soybean Fields in Thailand. Multiple Cropping Center. Faculty of Agriculture. Chiang Mai University. Chiang Mai Thailand. 408 pp.

ตารางที่ 1 ค่า Relative density (RD), Relative frequency (RF) **และ** Sum Dominance Ratio (SDR) **ของวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง**

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
1	หญ้าสาบ	*Chromolaena sp.*	Asteraceae	B	29.1	11.3	20.2
2	หญ้าตีนนก	*Digitaria ciliaris* (Resz.) Koel.	Poaceae	N	7.5	9.3	8.4
3	แห้วหมู	*Cyperus rotundus* L.	Cyperaceae	S	8.9	5.6	7.2
4	แมงลักคา	*Hyptis sauveolens* Point.	Laminaceae	B	8.7	2.4	5.5
5	กระดุมขน	*Mitracapus vilosus (SW.)DC.*	Rubiaceae	B	4.1	3.6	3.8
6	หญ้าปากควาย	*Dactyloctenium aegyptium*(L.)P.B.	Poaceae	N	2.5	5.0	3.7
7	ตีนตุ๊กแก	*Tridax procumbens* L.	Asteraceae	B	3.0	4.0	3.5
8	หญ้าตีนติด	*Brachiaria reptans* (L.)Gard.&Hubb.	Poaceae	N	2.8	3.5	3.2
9	เทียนนา	*Ludwigia hyssopifolia* (G.don.) Excell.	Onagraceae	B	3.2	2.9	3.1
10	โสนดอน	*Aeschynomene americana* L.	Papilionaceae	B	1.7	3.5	2.6
11	ลูกใต้ใบ	*Phyllanthus amarus Schum.&Th.*	Euphorbiaceae	B	1.7	2.9	2.3
12	หญ้ายาง	*Euphorbia heterophylla* L.	Euphorbiaceae	B	2.3	2.2	2.3
13	ไมยราบ	*Mimosa pudica* L.	Mimosoideae	B	1.4	2.8	2.1
14	สาบแร้งสาบกา	*Ageratum conyzoides* L.	Asteraceae	B	2.4	1.4	1.9

1362

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
15	กระดุมใบใหญ่	*Borreria latifolia (aubl.)*Schum	Rubiaceae	B	1.7	2.0	1.9
16	หนวดปลาดุก	*Fimbristylis miliacea* (L.)Vahl	Cyperaceae	S	1.4	1.6	1.5
17	สร้อยนกเขา	*Mollugo penthaphylla* L.	Aizoaceae	B	1.3	1.5	1.4
18	หญ้านกสีชมพู	*Echinochloa colona* (L.)Link.	Poaceae	N	1.0	1.7	1.3
19	กระต่ายจาม	*Scoparia dulcis L.*	Scrophulariaceae	B	1.0	1.5	1.3
20	สาบเสือ	*Chromolaena odoratum* (L.)R.M.King&	Asteraceae	B	0.7	1.8	1.2
21	หญ้าไข่เหา	*Eragrostis sp.*	Poaceae	S	1.6	0.6	1.1
22	ตดหมูตดหมา	*Paederia linearis* Hook.f.	Rubiaceae	B	0.4	1.7	1.0
23	หญ้าท่าพระ	*Richadia scabra* L.	Rubiaceae	B	1.0	1.0	1.0
24	ปอวัชพืช	*Corchorus olitorius* L.	Tiliaceae	B	0.5	1.2	0.8
25	ถั่วลิสงนา	*Alysicarpus vaginalis* (L.)DC.	Papilionoideae	B	0.4	1.1	0.7
26	หญ้าตีนกา	*Eleusine indica L. Gaertn.*	Poaceae	N	0.4	1.1	0.7
27	หญ้าละออง	*Vernonia cinerea(L.)Less.*	Asteraceae	B	0.4	1.1	0.7
28	น้ำนมราชสีห์	*Euphorbia hirta L.*	Euphorbiaceae	B	0.3	1.1	0.7

1363

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
29	หญ้าขันกาด	*Panicum repen L.*	Poaceae	N	0.6	0.8	0.7
30	หญ้ากาบหอย	*Lindernia crustacia(L.)F.V.M.*	Scrophulariaceae	B	0.6	0.7	0.7
31	ไมยราบเลื้อย	*Mimosa invisa Mart.*	Mimosoideae	B	0.3	1.0	0.7
32	สะอึก	*Ipomoea gracilis R.H.*	Convolvulaceae	B	0.2	1.0	0.6
33	หญ้านมหนอน	*Paspalum conjugatum Berg.*	Poaceae	N	0.4	0.7	0.6
34	ผักแครด	*Synedrella nodriflora (L.)Gaertn.*	Asteraceae	B	0.4	0.7	0.6
35	พันงูเขียว	*Stachytarpheta indica(L.)Vahl*	Verbenaceae	B	0.6	0.4	0.5
36	หญ้าแพรก	*Cynodon dactylon (L.)Pers.*	Poaceae	N	0.3	0.7	0.5
37	ผักปลาบนา	*Cyanotis axillaris Roem.&Schult.*	Commelinaceae	B	0.2	0.7	0.5
38	หญ้าหนวดแมว (กก)	*Bulbostylis barbata (Rottb.)C.B.Clark.*	Cyperaceae	S	0.3	0.7	0.5
39	ต้อยติ่ง	*Ruellia tuberosa L.*	Acanthaceae	B	0.4	0.6	0.5
40	ผักขม	*Amaranthus viridis L.*	Amaranthaceae	B	0.3	0.6	0.4
41	หญ้าขจรจบดอกเล็ก	*Pennicetum polystachyon (L.)Schut.*	Poaceae	N	0.3	0.6	0.4
42	ครอบฟันสี	*Abutilon indicum (L.)Sweet.*	Malvaceae	B	0.2	0.6	0.4

1364

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
43	ผักเบี้ยใหญ่	*Portulaca oleracea* L.	Portulacaceae	B	0.2	0.6	0.4
44	ขยุ้มตีนหมา	*Ipomoea pes-tigridis L.*	Convolvulaceae	B	0.1	0.6	0.4
45	หญ้าคา	*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.	Poaceae	N	0.2	0.5	0.3
46	กินกุ้งน้อย	*Murdannia nudriflora (L.) Brenan*	Commelinaceae	B	0.2	0.5	0.3
47	กระดุมใบเล็ก	*Borreria laevis(Lamk.)Griseb.*	Rubiaceae	B	0.3	0.4	0.3
48	กกดอกตุ้ม	*Cyperus kyllingia* Endl.	Cyperaceae	S	0.2	0.4	0.3
49	หญ้าไม้กวาด	*Sida acuta* Burm.f.	Malvaceae	B	0.1	0.5	0.3
50	ผักเสี้ยนผี	*Cleome viscosa L.*	Capparidaceae	B	0.2	0.4	0.3
51	กระถินทุ่ง	*Xyris indica L.*	Xyridaceae	B	0.3	0.2	0.3
52	ผักขมหนาม	*Amaranthus spinosus L.*	Amaranthaceae	B	0.2	0.4	0.3
53	หญ้าขจรจบดอกเหลือง	*Pennicetum setosum (Swz.)L.C.Rich.*	Poaceae	N	0.1	0.4	0.2
54	เงี่ยงป่า	*Lindernia ciliata (Colsm)Penn.*	Scrophulariaceae	B	0.1	0.4	0.2
55	ผักเสี้ยน (ดอกชมพู)	*Cleome rutidospema DC.*	Capparidaceae	B	0.1	0.4	0.2
56	กะทกรก	*Passiflora foetida L.*	Passifloraceae	B	0.1	0.4	0.2

1365

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
57	หญ้าโขย่ง	*Rottboellia exaltata L.f.*	Poaceae	N	0.1	0.3	0.2
58	พะดอเงียว	*Dicanthium annulatum (Forssk.)Stapf.*	Poaceae	N	0.1	0.3	0.2
59	กกทราย	*Cyperus iria L.*	Cyperaceae	S	0.1	0.3	0.2
60	หนาดเหลี่ยม	*Laggera pterodonta (DC.)Sch.Bip.ex Oliv..*	Asteraceae	B	0.2	0.1	0.2
61	หญ้าดอกชมพู	*Rhynchelytrum repens (Willd.) C.E.Hubb.*	Poaceae	N	0.1	0.2	0.2
62	หญ้าหวาย	*Eragrostis tenella (L.)P.Beauv.ex.Roem et.Schult.*	Poaceae	N	0.1	0.2	0.2
63	ถั่วผี	*Pentapetes phoenicea L.*	Sterculiaceae	B	0.0	0.2	0.1
64	ผักขมหิน	*Boerhavia electa* L.	Nyctaginaceae	B	0.1	0.2	0.1
65	หญ้านิ้วหนู	*Fimbristylis dichotoma* (L.)Valh.	Cyperaceae	S	0.0	0.2	0.1
66	หญ้าดอกขาว	*Leptochloa chinensis* (L.)Nees.	Poaceae	N	0.0	0.2	0.1
67	หญ้ากำมะหยี่	*Lagascea mollis* Cav.	Asteraceae	B	0.1	0.1	0.1
68	หญ้ามาเลเซีย	*Axonopus compressus* (Sw.)P.Beauv.	Poaceae	N	0.1	0.1	0.1
69	ส้มกบ	*Oxalis corniculata* L.	Oxalidaceae	B	0.0	0.1	0.1
70	กกสามเหลี่ยม	*Scirpus grossus* L.	Cyperaceae	S	0.0	0.1	0.1

1366

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช		วงศ์	ประเภท[1]	%		
				RD[2]	RF[3]	SDR[4]
71 กะเม็ง	*Eclipta alba* L.	Asteraceae	B	0.0	0.1	0.1
72 หญ้าขน	*Brachiaria mutica* (Forsk)Stapf.	Poaceae	B	0.0	0.1	0.1
73 ผักบุ้ง	*Ipomoea aquatica Forsk.*	Convolvulaceae	B	0.0	0.1	0.1
74 เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia L.*	Sterculiaceae	B	0.0	0.1	0.1
75 ผักปลาบ	*Commelina benghalensis* L.	Commelinaceae	B	0.0	0.1	0.1
76 มะหิ่งแม่น	*Crotalaria pallida* Aiton	Papilionoideae	B	0.0	0.1	0.1
77 หญ้าคออ่อน	*Crassocephalum crepidioides (Benth.) S. Moore.*	Asteraceae	B	0.0	0.1	0.1
78 เฟิน	*Lygodium sp.*	Schizaeaceae	F	0.1	0.1	0.1
79 ห้วยชินสีห์	*Rotala indica (Willd.)Koehne*	Lythraceae	B	0.1	0.1	0.1
80 หญ้าไม้กวาดใบใหญ่	*Sida rhombifolia L.*	Malvaceae	B	0.1	0.1	0.1
81 หนาดน้อย (ดอกเหลือง)	*Gnaphalium affine D.Don.*	Asteraceae	B	0.1	0.1	0.1
82 หญ้าเจ้าชู้	*Heteropogon contortus (L.)Roem.&Schult.*	Poaceae	N	0.0	0.1	0.1
83 ตำแย	*Laportia bulbifera(Siebold&Zucc).Wedd.*	Urticaceae	B	0.0	0.1	0.0
84 โคกกระสุน	*Tribulus terrestis L.*	Zygophyllaceae	B	0.0	0.1	0.0

1367

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช		วงศ์	ประเภท[1]	%		
				RD[2]	RF[3]	SDR[4]
85 ผักเสี้ยน (ดอกขาว)	*Cleome gynandra L.*	Capparidaceae	B	0.0	0.1	0.0
86 กกสามเหลี่ยมใหญ่	*Cyperus sp.*	Cyperaceae	S	0.0	0.1	0.0
87 โทงเทง	*Physalis minima* L.	Solanaceae	B	0.0	0.1	0.0
88 ผักปลาบ	*Commelina diffusa* Burm.f.	Commelinaceae	B	0.0	0.1	0.0
89 กกสามเหลี่ยมเล็ก	*Cyperus imbricatus* L.	Cyperaceae	S	0.0	0.1	0.0
90 ค้อนกลอง	*Spheranthus africanus* L.	Asteraceae	B	0.0	0.1	0.0
91 กก	*Cyperus sp.*	Cyperaceae	S	0.0	0.1	0.0
92 จ้อล่อ	*Conyza sumatrensis(* Retz.)Walker.	Asteraceae	B	0.0	0.1	0.0
94 ผักเบี้ยหิน	*Trianthema portulacastrum* L.	Aizoaceaee	B	0.0	0.1	0.0
95 หญ้าตอแหล	*Leptochloa panicea* (Retz.)Ohwi.	Poaceae	N	0.0	0.1	0.0
96 หญ้าไผ่	*Ottochloa nodosa* (Kunth)Dandy	Poaceae	N	0.0	0.1	0.0
97 หญ้ารังนก	*Chloris barbata* Sw.	Poaceae	N	0.0	0.1	0.0
98 กินกุ้งหลวง	*Cyanotis axiiaris R.& S.*	Commelinaceae	B	0.0	0.0	0.0

1368

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดวัชพืช			วงศ์	ประเภท[1]	%		
					RD[2]	RF[3]	SDR[4]
99	ทหารกล้า	*Galinsoga paviflora* Cav.	Asteraceae	B	0.0	0.0	0.0
100	ทหารกล้าขน	*Galinsoga ciliata* (Raf.) Blake.	Asteraceae	B	0.0	0.0	0.0
101	บานเที่ยง	*Pentapetes phoenicea L.*	Sterculiaceae	B	0.0	0.0	0.0
102	หญ้าขจรจบดอกใหญ่	*Pennicetum pedicellatrumTrin.*	Poaceae	N	0.0	0.0	0.0
103	หญ้าสะกาดน้ำเค็ม	*Paspalum distichum L.*	Poaceae	N	0.0	0.0	0.0

1 : B = วัชพืชประเภทใบกว้าง N = วัชพืชประเภทใบแคบ S = วัชพืชประเภทกก F = เฟิน

2 : RD = Relative density

3 : RF = Relative frequency

4 : SDR = Sum Dominance Ratio dominant ratio

1369

การจำแนกและคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่มีผลต่อการงอกของกล้วยไม้

Identification and Screening of Mycorrhizal Fungi for Seed Germination of Orchid

พรพิมล อธิปัญญาคม[1] ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช[2]
[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

ราไมคอร์ไรซาเป็นราที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ ช่วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เพื่อให้ทราบชนิดของราไมคอร์ไรซาที่อยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย จึงได้รวบรวม แยก และจำแนกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ 8 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน เอื้องช้าง ว่านน้ำทอง อั้วพวงมณี เอื้องข้าวเหนียวลิง และ เอื้องดินใบหมาก จากจังหวัดเชียงใหม่ อุบลราชธานี กาญจนบุรี กระบี่ และกรุงเทพ ฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2549 – เดือนกันยายน 2551 โดยทำการแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ผลการดำเนินงานได้ราทั้งหมด 40 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดราเป็นราสกุล *Rhizoctonia* 3 ชนิด เป็น Binucleate *Rhizoctonia* ได้แก่ *Rhizoctonia globularis, R. goodyerae-repentis* และ *R. repens* เมื่อนำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบเจริญได้ดีบน OMA 5 isolates คือ *R. globularis* (RZO 0009), *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และ *R. repens* (RZO 0010, 0021, 0022) เมื่อนำทั้ง 5 isolates มาทดสอบการมีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพในการกระตุ้นให้เมล็ดเอื้องดินใบหมากงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งแตกต่างกับ *R. repens* (RZO 0021, 0022) และ *R. globularis* (RZO 0009) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ 98.8, 98.2 และ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน แต่สามารถเจริญเป็นต้นอ่อนในเวลา 120 วัน ได้เพียง 23.2, 22.0 และ 17.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่รา *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และกรรมวิธีเพาะเมล็ด

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-24-51

ที่ไม่ได้ใส่ราไมคอร์ไรซา สามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เท่านั้น ไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้และตายในที่สุด จากการทดลองนี้รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องดิน ใบหมากและได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำนำ

ราสกุล *Rhizoctonia* เป็นราไมคอร์ไรซาชนิดหนึ่งที่เจริญอยู่ร่วมกับรากกล้วยไม้โดยมีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (symbiosis) โดยราสร้างเส้นใยเข้าไปในรากกล้วยไม้ เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ สร้างโครงสร้างภายในเซลล์เรียกว่า peloton ราชนิดนี้ไม่ได้เข้าทำลายรากพืช แต่จะให้ธาตุอาหารแก่พืช เช่นธาตุคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานที่สำคัญกับพืชและช่วยส่งเสริมให้เมล็ดกล้วยไม้งอก (Hadley, 1982; Harley and Smith, 1983) ในทางตรงกันข้ามราสกุลนี้เป็นสาเหตุของโรคพืชหลายชนิดได้แก่ โรคใบติดของทุเรียนสาเหตุเกิดจาก *Rhizoctonia solani* โรคกาบใบแห้งของข้าว สาเหตุเกิดจาก *R. solani* เป็นต้น (Sneh *et al*., 1991) แต่สำหรับความสัมพันธ์กับพืชตระกูลกล้วยไม้แล้ว ราชนิดนี้มีความสัมพันธ์แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันระหว่างกล้วยไม้กับรา ในด้านช้วยส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ เนื่องจากเมล็ดกล้วยไม้มีขนาดเล็กมาก มีอาหารสะสมในเมล็ดน้อยมากทำให้ไม่มีอาหารไปเลี้ยงในขณะที่กล้วยไม้งอก ดังนั้นเมล็ดกล้วยไม้บางชนิดจึงงอกยากหรือไม่งอกเลย แต่อย่างไรก็ตามในสภาพธรรมชาติพบว่ามีราไมคอร์ไรซาเจริญอยู่ในรากกล้วยไม้แบบ เกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Rhizoctonia* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ ช่วยให้เมล็ดกล้วยไม้สามารถงอกได้ โดยให้ธาตุอาหารและกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้า (Clements, 1988)

งานวิจัยเรื่องความสัมพันธ์ของราไมคอร์ไรซากับรากกล้วยไม้เริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ปี 1899 โดย Bernard เป็นบุคคลแรกที่ศึกษาไมคอร์ไรซากล้วยไม้ พบความสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงของรากับกล้วยไม้โดยราช่วยกระตุ้นการเจริญและการงอกของเมล็ด Bernard ได้ดำเนินการทดลองโดยแยกราจากรากกล้วยไม้ *Cattleya* และพบว่ารานี้ช่วยกระตุ้นการเจริญของกล้วยไม้ *Cattleya* แต่เมื่อนำราชนิดนั้นมาเลี้ยงร่วมกับกล้วยไม้ *Phalaenopsis* และ *Odontoglossum* ปรากฏว่าราไม่ได้ช่วยกระตุ้นการเจริญของต้นกล้าทั้งสองชนิดนี้แต่ทำให้กล้วยไม้ดังกล่าวตาย จากการทดลอง Bernardสรุปว่าราไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับรากกล้วยไม้ มีความเฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้แต่ละ

ชนิด(Bernard, 1909) ต่อมา Hadley (1970) ศึกษาการเพาะเมล็ดแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน ระหว่างรา *Rhizoctonia* ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ต่าง ๆ รวม 32 สายพันธ์ พบว่าราเหล่านั้นไม่มีความเฉพาะเจาะจงต่อกล้วยไม้ จากนั้นก็มีการศึกษาถึงความเฉพาะเจาะจงของราและรากกล้วยไม้กันมาก และพอสรุปว่ากล้วยไม้บางชนิดก็มีความเฉพาะเจาะจงกับราบางชนิดเช่นกัน

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาราไมคอร์ไรซากล้วยไม้กันมาก ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย สหราชอาณาจักร เดนมาร์ก แคนาดา สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ไต้หวัน สิงคโปร์ อินเดีย และประเทศไทย โดยเฉพาะในประเทศออสเตรเลีย ที่ Kings Park Botanic Garden ได้ผลิตไมคอร์ไรซากับเมล็ดกล้วยไม้ขายเป็นการค้า เน้นทางด้านการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ไม่มากนัก ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ดิน ที่มีรายงานได้แก่ นันทนาและคณะ (2543) Manoch และคณะ (2000) Athipunyakom และคณะ (200; 2002a; 2002b) เป็นต้น ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่ควรจะทำการศึกษาโดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ราไมคอร์ไรซาของกล้วยไม้ โดยการรวบรวมและจำแนกชนิดราในระดับ species เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลซึ่งกันและกัน (symbiotic germination) โดยเฉพาะเมล็ดกล้วยไม้ที่งอกยาก เมล็ดกล้วยไม้ที่กำลังสูญพันธุ์ ซึ่งจะเป็นการอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้ และยังเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มผู้เลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างราก ได้แก่ พลั่ว กรรไกรตัดแต่งกิ่ง และภาชนะเก็บราก
2. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายคลอร็อกซ์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%
3. อาหารวุ้นสังเคราะห์
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ในการแยกเชื้อ
5. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

เก็บรากกล้วยไม้ดินที่ปลูกในกระถาง และปลูกในดิน จากแหล่งต่าง ๆ ในภาคเหนือ ภาค

กลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ โดยตัดรากห่อกระดาษ ใส่ถุงพลาสติค และบันทึกรายละเอียดชนิดกล้วยไม้ แหล่งที่เก็บ และวันที่เก็บ เก็บบรรจุรากกล้วยไม้ห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2. การแยกราจากเส้นใยที่เจริญอยู่ในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้

แยกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ โดยทำความสะอาดรากกล้วยไม้ แช่ชิ้นส่วนรากในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง และนำชิ้นส่วนรากมาตัดเป็นชิ้นบาง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo ในตู้ปลอดเชื้อ แยกเส้นใยราที่เจริญอยู่รวมกันในชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ มาวางบนอาหารวุ้นสังเคราะห์สูตร NDY (1/6) ผสมสารปฏิชีวนะ steptomycin และ tetracycline บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 3-10 วัน ใช้เข็มปลายแหลมตัดปลายเส้นใยมาวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

3. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

3.1 ลักษณะของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของโคโลนีด้านบนและด้านล่างอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งการสร้างเม็ด sclerotium

3.2 ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo และ light microscope โดยศึกษาลักษณะและวัดขนาดของเส้นใย ลักษณะเส้นใยตั้งฉาก ลักษณะรูปร่างและขนาดของ monilioid cell ของราที่เจริญบนอาหาร และ การสร้าง sclerotiumถ่ายภาพราจากกล้องจุลทรรศน์แบบ compound เปรียบเทียบลักษณะของราดังกล่าวกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา (Moore, 1987; Sneh *et al.,* 1991; Roberts, 1999)

3.3 ศึกษาจำนวนนิวเคลียสต่อหนึ่งเซลล์โดยการย้อมสีด้วย Safranin O (Bandoni, 1979)

4. คัดเลือกราไมคอร์ไรซา

4.1 นำราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากรากกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเลี้ยงรา บนอาหาร PDA สำเร็จรูป ให้เชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นาน 5-7 วัน

4.2 และนำมาคัดเลือกโดยเลี้ยงบนอาหาร OMA โดยเทอาหาร OMA ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของรา นำมาวางบนกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแต่ละชนิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ

บันทึกผลการทดลอง

วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเส้นใยของราบนอาหารแต่ละชนิดเมื่อเส้นใยของราบนอาหารชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. ทดสอบศักยภาพของราไมคอร์ไรซาที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ คือ

กรรมวิธีที่ 1 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. repens* (ROZ 0010) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 2 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. repens* (ROZ 0021) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 3 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. repens* (ROZ 0022) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 4 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R.a globularis* (ROZ 0021) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 5 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ใส่รา *R. goodyerae-repentis* (ROZ 0036) บนอาหาร OMA

กรรมวิธีที่ 6 เพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากโดยไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา เลี้ยงบนอาหาร OMA

5.1 เตรียมฝักกล้วยไม้

5.2 เตรียมราไมคอร์ไรซา เลี้ยงราไมคอร์ไรซาที่คัดเลือกมาได้จากข้อ 4 โดยคัดเลือกมาจำนวน 5 isolates ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร OMA จนกระทั่งเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3 เตรียมอาหาร OMA ใส่ลงในขวดขนาด 5x10 เซนติเมตร และเตรียมกระดาษกรอง Whatman No. 1 ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 1x4 เซนติเมตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5.4 เพาะเมล็ดแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน (Symbiotic Germination)

ทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากในสภาพปลอดเชื้อโดยวิธีของ Athipunyakom (2004) และใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วกรีดฝักกล้วยไม้ตามแนวยาว ผ่าครึ่งเป็น 2 ซีก ใช้ปากคีบคีบเมล็ดกล้วยไม้ใส่ลงในขวดน้ำที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปปรับปริมาณของเมล็ดด้วย Haemacytometer ให้มีปริมาณเมล็ดกล้วยไม้จำนวน 100 เมล็ด/มิลลิลิตร

ใช้ปากคีบคีบกระดาษกรอง Whatman No. 1 ขนาด 1x4 เซนติเมตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 5.3 มาวางลงบนอาหาร OMA ที่อยู่ในขวดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นนำเมล็ดกล้วยไม้ในขวดที่อยู่ในน้ำมาเขย่าให้สม่ำเสมอและใช้ไปเปตที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายที่มีเมล็ดกล้วยไม้มาจำนวน 1 มิลลิลิตร (มีเมล็ดกล้วยไม้ 100 เมล็ด) ใส่ลงบนกระดาษกรองที่วางบนอาหาร OMA แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของราไมคอร์ไรซาที่เตรียมไว้ในข้อ 5.2 นำมาวางบนอาหาร OMA ห่างจากกระดาษกรอง 1.5 เซนติเมตร เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งเมล็ดกล้วยไม้เริ่มงอกจึงนำออกมาวางภายใต้แสง

บันทึกผลการทดลอง

บันทึกผลการทดลองโดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาการเจริญของเมล็ดกล้วยไม้เป็นต้นอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereo ในช่วงระยะ 21, 60 และ 120 วันหลังจากทำการเพาะเมล็ด

วิธีการประเมินผลโดยใช้วิธีของ Athipunyakom (2004)

0 = เมล็ดที่สมบูรณ์ ยังไม่งอก (no germination)

1 = embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก (seed coat ruptured by enlarged embryo)

2 = embryo มีลักษณะเป็นก้อนกลมปลายแหลมมีรากขนอ่อนเจริญออกมา (presence of rhizoids)

3 = ผลิใบยอดปลายแหลม 1 ใบ (presence of leaf primordium)

4 = สร้างใบจริง (appearance of the first true leaf)

5 = ต้นอ่อนมีใบยอด (elongation of initial leaf)

6 = สร้างระบบราก (elongation of root)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น – สิ้นสุด ตุลาคม 2548 – กันยายน 2552

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างรากกล้วยไม้

จากสำรวจและเก็บรวบรวมกล้วยไม้จากจังหวัดเชียงใหม่ อุบลราชธานี กาญจนบุรี กระบี่ และกรุงเทพ ฯ ระหว่างเดือนตุลาคม 2548 – เดือนกันยายน 2551 จากกล้วยไม้ 8 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีฝาหอย (*Paphiopedilum bellatulum*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) เอื้องช้าง (*Cymbidium tracyanum*) ว่านน้ำทอง *(Ludisia discolor*) อั้วพวงมณี (*Calanthe rubens*) เอื้องข้าวเหนียวลิง (*C. rosea*) และ เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata*)

2. การจำแนกราไมคอร์ไรซา

จากการจำแนกราไมคอร์ไรซาจากตัวอย่างรากกล้วยไม้ ที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ แยกเชื้อได้ 30 สายพันธุ์ จำแนกชนิดของราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ลักษณะของโคโลนี ลักษณะและขนาดของเส้นใย ลักษณะ รูปร่าง และขนาดของ monilioid cell ของราที่เจริญบนอาหาร การสร้าง sclerotium และจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ จากการศึกษาได้รา *Rhizoctonia* จำนวน 30 สายพันธุ์ จำแนกชนิดได้รา *Rhizoctonia globularis, R. goodyerae-repentis* และ *R. repens* (ตารางที่ 1)

รายละเอียดของรามีดังนี้

Rhizoctonia globularis H.K. Saksena & Vaartaja, Can.J.Bot. 38: 939, 1960

พืชอาศัย : เอื้องดินใบหมาก

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว ถึงขาวอมชมพู เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร และเส้นใยเจริญขึ้นมาเหนืออาหารบริเวณตรงกลางโคโลนีเกิดเป็นวงเรียงซ้องกัน บนอาหาร potato dextrose agar เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยมีขนาด 2.5-3.5 ไมครอน ไม่มีสี มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก แต่ส่วนใหญ่เอียงเป็นมุม 45 องศาเซลเซียส มากกว่าเส้นใยตั้งฉาก

Monilioid cells ไม่มีสี รูปร่างกลมถึงค่อนข้างกลม ขนาด 8.0- x 10.5 ไมครอน แตกกิ่งก้านสั้น ๆ หรือไม่แตกกิ่งก้านเลย เรียงต่อกันประมาณ 3-8 เซลล์ บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium

การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้ ซึ่งการชักนำให้ราสร้างสปอร์ระยะนี้ยากมาก ส่วนใหญ่มักพบในสภาพธรรมชาติ รา *Endoperplexa enodulosa* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของราชนิดนี้

ราชนิดนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับรา *R. repens* ที่บรรยายลักษณะของราโดย Curtis (1939) และ Burgeff (1959) ซึ่งลักษณะของโคโลนีของรา *R. globularis* ที่มีเส้นใยเจริญขึ้นมาเหนืออาหารบริเวณตรงกลางโคโลนีเกิดเป็นวงเรียงซ้องกันชัดเจนกว่า *R. repens* และมีขนาดของ monilioid cells ที่เล็กกว่า ทำให้สามารถแยกชนิดได้อย่างชัดเจน (Saksena and Vaartaja, 1960)

Rhizoctonia repens N. Bernard, Ann. Sci. Nat, IX (9) ; 31 (1909)

พืชอาศัย : เอื้องข้าวเหนียวลิง เอื้องช้าง รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกระบี่ อั้วพวงมณี เอื้องดินใบหมาก

โคโลนี บนอาหาร PDA มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ โคโลนี สีขาว ถึง ครีม เส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร เกิดเป็นวงเรียงซ้องกัน บนอาหาร Corn meal agar โคโลนี สีขาวถึงครีม เส้นใยเจริญใต้อาหาร และรวมตัวกันอย่างหลวม ๆ เกิดเป็น sclerotia

เส้นใยไม่มีสี ขนาด 2.5-4.0 ไมครอน มีผนังกั้นเซลล์ นิวเคลียสเป็น binucleate เส้นใยตั้งฉาก Monilioid cells ไม่มีสี รูปร่างกลมถึงรี ขนาด 6.5-10.8 x 7.5-14.2ไมครอน เรียงต่อกันเป็นลูกโซ่สั้น ๆ แตกกิ่งก้านสั้น ๆ หรือไม่แตกกิ่งก้านเลย บางครั้ง monilioid cells รวมตัวกันเป็นกลุ่มต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้

รา *Tulasnella deliquescens* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของราชนิดนี้

รา *R. repens* เป็นราที่พบแพร่หลายในรากกล้วยไม้หลายชนิด ซึ่ง Bernard (1909) เป็นบุคคลแรกที่แยกราชนิดนี้มาจากรากกล้วยไม้แคทลียา (*Laelio-Cattleya canhamiana)* ซึ่งมีลักษณะของโคโลนี ขนาดของเส้นใย และลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกับการศึกษาครั้งนี้

ต่อมา Curtis (1939) และ Burgeff (1959) ทำการศึกษาแยกราไมคอร์ไรซาจากกล้วยไม้หลายชนิดใน Wisconsin และจำแนกชนิดเป็นรา *R. repens* มีลักษณะของเส้นใยเจริญอยู่ใต้อาหาร และมีขนาดของ monilioid cells ใกล้เคียงกับลักษณะของ Bernard บรรยายไว้

Currarh *et al* (1987) พบรา *R. repens* .ในรากของกล้วยไม้ *Platanthera obtusata* ในเมืองอัลเบอร์ต้า ประเทศแคนาดา

ในประเทศอินเดีย Senthikumar และ Krishnamurthy (1998) ได้ศึกษาลักษณะทางเซลล์วิทยาของรา *R. repens* ที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ซึ่งตรงกับการศึกษาครั้งนี้ที่แยกราชนิดนี้ได้ในเอื้องดินใบหมากเช่นเดียวกัน

Rhizoctonia goodyerae - repentis Costantin & Dufour, Mycotaxon 29: 94. 1987

พืชอาศัย: ว่านน้ำทอง (*Lusidia discolor)* เอื้องดินใบหมาก

โคโลนี เจริญอย่างเร็วบนอาหาร PDA และโคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร เมื่ออายุ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โคโลนีมีสีขาว ถึง ครีม เมื่ออ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอมส้มเมื่อแก่ เกิด concentric zonation บนอาหาร เส้นใยที่เจริญอยู่เหนืออาหารไม่มีสีและเปลี่ยนเป็นสีแทน หลังอายุ 14 วัน มักพบเส้นใยหรือ moniliod cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม ต่อมาพัฒนาเป็น sclerotium เจริญอยู่ใต้วุ้นอาหารเรียกว่า microsclerotium

เส้นใยกว้าง 4.0 – 5.3 ไมครอน มีผนังกั้นเซลล์ เส้นใยตั้งฉาก monilioid cells รูปร่างคล้ายถังเบียร์ ถึงรูปรี ขนาด 15.4–(20.6)–26.4 x 6.9–(10.6)–11.3 ไมครอน นิวเคลียสมี 2 นิวเคลียส ต่อ 1 เซลล์ (binucleate)

การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถชักนำราให้สร้างสปอร์ระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศได้ รา *Ceratobasidium corginerum* เป็นระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศของราชนิดนี้

R. goodyerae – repentis เป็นราไมคอร์ไรซาที่พบในกล้วยไม้ดินหลายชนิด (Alexander and Hadley, 1985; Currah *et al*., 1990; Zelmer and Currah, 1997) และยังพบในกล้วยไม้เกาะอาศัยด้วย Richardson *et al.* (1993) รายงานแยกได้ราชนิดนี้จากกล้วยไม้เกาะอาศัย *Campylocentrum micranthum* ในประเทศคอสตาริก้า

Warcup and Talbot (1971) ศึกษาการชักนำรา *R. goodyerae – repentis* ให้สร้างระยะสืบพันธุ์แบบใช้เพศ โดยแยกราจากรากกล้วยไม้เกาะอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ *Pomatocalpa macphersonii* และ *Robiquetia wassellii* จากรัฐควีนแลนส์ตอนเหนือ ประเทศออสเตรเลีย จำแนกชนิดได้รา *R. goodyerae-repentis* และสามารถชักนำราให้สร้างระยะการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ คือ รา *C. corginerum*

4. คัดเลือกราไมคอร์ไรซา

การคัดเลือกราไมคอร์ไรซาจากจำนวน 25 isolates คัดเลือกจากราที่เจริญได้ดีบนอาหาร oat meal agar (OMA) จากการคัดเลือกครั้งนี้สามารถคัดเลือกได้ 5 isolates โดยราเจริญบนอาหาร OMA เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อภายใน 3 วัน คือ *Rhizoctonia globularis* (RZO 0009), *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และ *R. repens* (RZO 0010, 0021, 0022) จากนั้นนำราทั้ง 5 isolates นี้ไปทดสอบศักยภาพในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้แบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหาร OMA ซึ่งเป็นอาหารสำหรับการเจริญของราไมคอร์ไรซา ไม่ใช่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ ในการคัดเลือกราไมคอร์ไรซาที่เจริญบนอาหาร OMA ภายในเวลา 3 วัน นั้น เพราะว่าราไม-คอร์ไรซาที่เจริญได้เร็วนั้นจะสามารถสัมผัสเมล็ดกล้วยไม้ได้เร็วกว่าและสร้างเส้นใยเข้าไปในเมล็ดกล้วยไม้ได้อย่างเร็วก็มีผลทำให้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ได้อย่างรวดเร็ว สำหรับราที่เจริญบนอาหาร OMA ได้ช้านั้นโอกาสที่ราจะสัมผัสกับเมล็ดก็ช้าไปด้วยทำให้เกิดการกระตุ้นการงอกของเมล็ดช้าลงไปด้วย ดังนั้นจึงต้องทำการคัดเลือกราไมคอไรซาเพื่อนำไปทดสอบศักยภาพในการส่งเสริมการงอกของเมล็ดกล้วยไม้

5. ทดสอบศักยภาพของราไมคอร์ไรซาที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้

การทดสอบการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากร่วมกับราไมคอร์ไรซาแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน และได้คัดเลือกมา 5 isolates พบว่า ราไมคอร์ไรซาทั้ง 5 ชนิดนี้ สามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ภายใน 21 วัน ในสภาพปลอดเชื้อ (ตารางที่ 2) และจากการตรวจสอบการงอกและการพัฒนาของเมล็ดกล้วยไม้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าหลังจากเพาะเมล็ด 21 วัน พบว่า embryo เริ่มขยายตัว และพบเส้นใยเจริญอยู่รอบเมล็ด ซึ่งเส้นใยของรานี้มี

ลักษณะตั้งฉาก เป็นลักษณะของราไมคอร์ไรซาที่ปลูกเชื้อไป เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดกล้วยไม้ก่อนที่จะปลูกเชื้อลงไป ต่อมาเอ็มบิโอขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตกออก และราสร้างกลุ่มของเส้นใย(peloton) เข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์ในเมล็ด กลุ่มของเส้นใยที่ราสร้างขึ้นนี้เมื่อสลายตัวไปกลายเป็นน้ำตาล และธาตุอาหารที่เมล็ดไปใช้ในการเจริญเป็นต้นอ่อน

เมล็ดกล้วยไม้ที่เพาะร่วมกับราไมคอร์ไรซาหลังจาก 21 วัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสามารถกระตุ้นให้เมล็ดเอื้องดินใบหมากงอกได้สูงสุดคือ 100% ในระยะเวลา 21 วันหลังจากเพาะ (ตารางที่ 2) ซึ่งเช่นเดียวกับ *R. repens* (RZO 0021, 0022) และ *R. globularis* (RZO 0009) ก็สามารถกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้งอกได้ถึง 98.8, 98.2 และ 96.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 21 วัน ในขณะที่รา *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และกรรมวิธีการเพาะเมล็ดที่ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น จากการทดลองนี้รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสูงที่สุดในการกระตุ้นให้เมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากงอกได้สูงสุดภายในเวลา 21 วัน ในทางตรงกันข้ามกับรา *R. goodyera-repentis* เมื่อนำไปเพาะกับเมล็ดกล้วยไม้นั้นพบว่ากล้วยไม้สามารถงอกได้ในระยะที่ embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก (ระยะที่ 1) เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นและไม่สามารถพัฒนาเป็นระยะอื่น ๆ ได้ ทั้ง ๆ ที่ราชนิดนี้ก็แยกมาจากกล้วยไม้ชนิดเดียวกัน แสดงว่าชนิดของราไมคอร์ไรซามีความจำเพาะเจาะจงต่อรากกล้วยไม้ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Narmatha *et al.* (2000) ศึกษาการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากและ *Dendrobium* โดยใช้ราไมคอร์ไรซาที่แยกได้จากเอื้องดินใบหมากพบว่าราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดเอื้องดินใบหมากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ . ในขณะที่ราไมคอร์ไรซาชนิดนี้สามารถกระตุ้นการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ *Dendrobium* ได้เพียง 36 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

หลังจากเพาะเมล็ด 120 วัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสามารถส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน ซึ่งเช่นเดียวกับ *R. repens* (RZO 0021, 0022) และ *R. globularis* (RZO 0009) สามารถช่วยในการพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้ในเวลา 120 วัน ได้เพียง 23.2, 22.0 และ 17.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่รา *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และกรรมวิธีการเพาะเมล็ดที่ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซาสามารถกระตุ้นให้เมล็ดงอกได้เพียง 20 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และไม่สามารถพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ จากการทดลองนี้คัดเลือกได้รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมการงอกและการพัฒนาเป็นต้นอ่อนของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ซึ่งมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับราไมคอร์ไรซาอื่น ๆ ที่แยกได้ (ตารางที่ 3) สำหรับการเมล็ดกล้วยไม้ที่ไม่ได้ใส่ไมคอร์ไรซานั้นเมล็ดสามารถงอกได้ในระยะที่ embryo ขยายตัวและเปลือกหุ้มเมล็ดแตก แต่ไม่สามารถ

เจริญพัฒนาเป็นต้นอ่อนได้ เพราะฉะนั้นการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซานั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการขยายพันธุ์กล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการรวบรวมและจำแนกราไมคอร์ไรซาจากรากกล้วยไม้ปกติ จำนวน 8 ชนิด ระหว่างเดือนตุลาคม 2549 – เดือนกันยายน 2551 และทำการแยกราไมคอร์ไรซาจากเส้นใยของราที่เจริญอยู่ในเซลล์ชั้นคอร์เท็กซ์ของรากกล้วยไม้ ได้ราทั้งหมด 30 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถจำแนกชนิดราเป็นราสกุล *Rhizoctonia* 3 ชนิด เป็น Binucleate *Rhizoctonia* ได้แก่ *Rhizoctonia globularis, R. goodyerae-repentis* และ *R. repens* และนำราไมคอร์ไรซาทั้งหมดมาทำการคัดเลือกการเจริญเติบโตบนอาหาร oat meal agar (OMA) พบราไมคอร์ไรซาจำนวน 5 isolates คือ *R. globularis* (RZO 0009), *R. goodyerae-repentis* (RZO 0036) และ *R. repens* (RZO 0010, 0021, 0022) ที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร OMA มาทดสอบศักยภาพที่มีประโยชน์ต่อการเพาะเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากแบบเกื้อกูลเอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน พบว่า รา *R. repens* (RZO 0010) มีศักยภาพสามารถกระตุ้นให้เมล็ดเอื้องดินใบหมากงอกได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 21 วัน และส่งเสริมให้เมล็ดพัฒนาเจริญเป็นต้นอ่อนได้ 45 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 120 วัน และได้ต้นอ่อนที่แข็งแรงในการนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนทดลอง ราไมคอร์ซาทั้งหมดได้เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ใน liquid paraffin และบน slant PDA ภายใต้อุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เอกสารอ้างอิง

นันทนา คำเมือง เลขา มาโนช จิตราพรรณ พิลึก และพรพิมล อธิปัญญาคม. 2543. การแยกเชื้อและจัดจำแนกชนิดไมคอร์ไรซากล้วยไม้, (หน้า 428-435) *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาพืช และส่งเสริมนิเทศศาสตร์เกษตร, 1-4 กุมภาพันธ์ 2543, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Alexander, C. and G. Hadley. 1985. Carbon movement between host and endophyte during the development of the orchid *Goodyera repens* Br. New Phytol. 101 : 657-656.

Athipunyakom, P. L. Manoch and M. Tanticharoen. 2001. Diversity of orchid mycorrhiza in Thailand, (pp. 41.) *In* Program and Extended Abstract of the First International Orchid Conservation Congress. September 24-28, 2001, Perth, Australia.

Athipunyakom, P., L. Manoch and M. Tanticharoen. 2002a. Mycohhizal fungi of seven *Paphiopedilum* species in Thailand, (pp. 141.) *In* The 7th International Mycological Congress. August 11-17, 2002 Olso , Norway.

Athipunyakom, P, L. Manoch and C. Piluek. 2002b. Mycorrhizal fungi from Terrestrial ordhids and symbiotic seed germination of *Spathoglottis plicata* Blume, (pp. 110.) *In* The 1st International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases. November 5-8, Chiang Mai, Thailand.

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.

Burgeff, H. 1959. Mycorrhiza of orchids, (pp. 361-395) *In* C.L. Withner, eds. The Orchids : A Scientific Survey. The Ronald Press Company, New York.

Clements, M.A. 1988. Orchid mycorrhizal associations. Lindleyana 3 : 73-86.

Currah, R.S., L.Sigler and S. Hambleton. 1987. New records and new taxa of fungi from mycorrhizae of terrestrial orchids of Alberta. Can. J. Bot. 65 : 2473-2482.

Currah, R.S., A Smreciu and S.Hambleton. 1990. Mycorrhizae and mycorrhizal fungi of boreal species of *Platanthera* and *Coeloglossum* (Orchidaceae). Can. J. Bot. 68 : 1171-1181.

Curtis, J.T. 1939. The relation of specificity of orchid mycorrhizal fungi to the problem of symbiosis. Am. J. Bot. 26 : 390.

Hadley, G. 1970. Non-specificity of symbiotic infection in orchid mycorrhiza. New Phytol. 69 ; 1015

Hadley, G. 1982. Orchid mycorrhiza, (pp. 81-118) *In* J. Arditti, ed. Orchid Biology : Reviews and Prespective, II. Cornell University Press, Ithaca, New York.

Harley, J.L. and S.E. Smith. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. London. Academic Press. 483 pp.

Manoch, L., P. Athipunyakom and M. Tanticharoen. 2000. *Rhizoctonia* – like fungi associated terrestrial orchid in Thailand, (pp. 63) *In* The 3rd International Symposium on *Rhizoctonia* (ISR 2000), National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (ROC), 17-20 August.

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, (pp. 13-35.) *In* Sneh, B, Suha Jabji-Hare, Stephen Neate and Gerda Dijst (eds). *Rhizoctonia* Speciec ; Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Narmatha, L.S., T.K. Tan and C.S. Loh. 2000. Symbiotic abilities of mycorrhizae isolated from terrestrially grown and epiphytic orchids, (pp. 56) *In* The 3rd International Symposium on *Rhizoctonia* (ISR 2000), national Chung Hsing University, Taichung, Taiwan (ROC), 17-20 August 2000.

Richardson, K.A., R.S. Currah and S. Hampleton. 1993. Basidiomycetous endophytes from roots of Neotropical epiphytic Orchidaceae. Lindleyana 8: 127-137.

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

4BSenthikimar, S. and K.V. Krishnamurthy. 1998a. A cytochemical atudy on the mycorrhizae of *Spathoglottis plicata*. Biologia Plantarum 41(1) : 111-119.

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

Warcup, J.H. and P.H.B. Talbot. 1971. Perfect states of Rhizoctonias associated with orchids II. New Phytol. 70 : 35-40.

Zelmer, C.D., and R.S. Currah. 1997. Symbiotic germination of *Spiranthes lacera* (Orchidaceae) with a naturally occuring endophyte. Lindleyana 12 (3) : 142-148.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 : ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้ที่แยกได้จากรากกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆของประเทศไทยระหว่างเดือนกันยายน 2548 – เดือนตุลาคม 2551

ชื่อกล้วยไม้	แหล่งเก็บ	สายพันธุ์	ราไมคอร์ไรซากล้วยไม้
รองเท้านารีเหลืองกระบี่	อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ อ. เมือง จ.กระบี่ อ. เขาพนม จ. กระบี่ อ. อ่าวลึก จ. กระบี่	RZO 0012 RZO 0013 RZO 0029 RZO 0030	*Rhizoctonia repens*
รองเท้านารีเหลืองปราจีน	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี อ. เมือง จ. กาญจนบุรี	RZO 0018 RZO 0019 RZO 0020	*Rhizoctonia repens*
รองเท้านารีฝาหอย	อ. เมือง จ.กระบี่ อ. เขาพนม จ. กระบี่ อ. อ่าวลึก จ. กระบี่ อ. เหนือคลอง จ. กระบี่	RZO 0014 RZO 0015 RZO 0025 RZO 0026	*Rhizoctonia repens*
ว่านน้ำทอง	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	RZO 0028 RZO 0017 RZO 0008	*Rhizoctonia goodyerae-repens*
เอื้องดินใบหมาก	อ.มูเซอ จ.ตาก	RZO 0053	*Rhizoctonia goodyerae-repens*
อั้วพวงมณี	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ	RZO 0027	*Rhizoctonia repens*
เอื้องช้าง	อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่ อุบลราชธานี	RZO 0005 RZO 0006 RZO 0007 RZO 0016	*Rhizoctonia repens*

เอื้องข้าวเหนียวลิง	อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่ อ. พร้าว จ. เชียงใหม่	RZO 0001 RZO 0002 RZO 0003 RZO 0004	*Rhizoctonia repens*
เอื้องดินใบหมาก	เขตบางซื่อ กรุงเทพ ฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ ฯ วงศ์สว่าง กรุงเทพ ฯ อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่ อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ เอ. พร้าว จ. เชียงใหม่	RZO 0021 RZO 0037 RZO 0039 RZO 0040 RZO 0041 RZO 0022 RZO 0042 RZO 0043 RZO 0023 RZO 0010 RZO 0044 RZO 0048 RZO 0011 RZO 0024	*Rhizoctonia repens*
เอื้องดินใบหมาก	สวนพฤกษศาสตร์สิริกิติ์ จ. เชียงใหม่	RZO 0009 RZO 0038	*Rhizoctonia globularis*

ตารางที่ 2: เปอร์เซ็นต์การงอกและการพัฒนาการเจริญของต้นอ่อนของเอื้องดินใบหมากหลังจากเพาะเมล็ดร่วมกับราไมคอร์ไรซา 21, 60, 120 วัน

ราไมคอร์ไรซา	การพัฒนาของกล้วยไม้ระยะต่าง ๆ หลังทำการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ร่วมกับราไมคอร์ไรซา												
	21 วัน			60 วัน					120 วัน				
	0	1	2	1	2	3	4	5	2	3	4	5	6
Rhizoctonia repens (ROZ 0010)	0	8.0	92.0	2.4	5.1	30.0	47.5	14.0	0	13.0	13.0	34.0	45.0
Rhizoctonia repens (ROZ 0021)	1.2	9.8	89.0	5.7	26.9	20.5	30.2	6.0	0	18	22	28	23.2
Rhizoctonia repens (ROZ 0022)	1.8	26.0	72.2	8.8	22.8	18	39	5	0	30	23.6	26	22
Rhizoctonia globolaris (ROZ 0009)	4.0	26.0	70.0	11.0	43.0	29.0	11.0	2.2	14.0	16.0	25.4	25.0	17.6
Rhizoctonia goodyerae-repentis (ROZ 0036)	80.0	20.0	0	8.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control	85.0	15.0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1385

ตารางที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นอ่อนของเมล็ดกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata*) ที่เพาะร่วมกับราไมคอร์ไรซา (*Rhizoctonia* spp.) ชนิดต่าง ๆเปรียบเทียบกับการเพาะเมล็ดกล้วยมีไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา (control)

ชนิดของราไมคอร์ไรซา	**การพัฒนาการเจริญเป็นต้นอ่อน ระยะที่ 6 (%)**
R. repens (ROZ 0010)	45.0a[1/]
R. repens (ROZ 0021)	23.2b
R. repens (ROZ 0022)	22.0b
R. globularis (ROZ 0009)	12.0c
R. goodyerae-repentis (ROZ 0036)	0d
ไม่ใส่ราไมคอร์ไรซา (control)	0d

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันทางทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

จุลินทรีย์ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

Enhance plant growth by using endophytic fungi

ชนินทร ดวงสอาด พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากต้นคะน้าปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลง จำนวน 2 พื้นที่ จาก ตำบลวังขนาย อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และ ตำบลดอนยายหอม อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยนำส่วนของใบและลำต้นมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธี triple surface sterilization ได้เชื้อราจำนวน 70 ไอโซเลท เมื่อตรวจและบ่งชนิดแล้วพบว่า เชื้อราที่แยกได้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อราได้เป็น 4 taxa คือ *Alternaria* spp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ Mycelia Sterilia

จากการคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญมีอัตราการเจริญเร็วที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลทได้แก่ *Nigrospora* sp. 3 ไอโซเลท (*Nigrospora*1, *Nigrospora*2 และ *Nigrospora*3)และ *Alternaria* sp. 2 ไอโซเลท (*Alternaria*1 และ *Alternaria*2) มาทำการทดสอบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดคะน้า พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ยกเว้น *Alternaria*1 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นกล้าคะน้าไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้าในระยะต้นกล้าเมื่อวัดผลจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าพบว่า ต้นกล้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ *Nigrospora*1 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์พบว่าคือ *Nigrospora sacchari* แต่ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-01-49

คำนำ

เชื้อเอ็นโดไฟท์ (endophyte) หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืช โดยไม่ทำให้พืชเกิดโรคและมีความสัมพันธ์กันแบบ mutualistic symbiosis เชื้อเอ็นโดไฟท์บางชนิดสร้างสารประกอบบางอย่างหรือปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัย ทำให้เยื่อเยื่อลดความดึงดูดต่อพวก herbivores และบางสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในทางกลับกัน เชื้อเอ็นโดไฟท์ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารอาหารต่างๆ จากพืช และดำรงชีวิตอยู่ภายในต้นพืช นอกจากนี้แล้วยังพบว่า เชื้อเอ็นโดไฟท์บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และสามารถใช้เป็น biological control agents โดยเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช หรือกระตุ้นให้เกิดความต้านทานของโรคแบบ systemic ได้ (Chanway, 1998)

Bacon (1977) พบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ส่วนใหญ่สามารถใช้ส่วนประกอบของเซลล์พืชได้ มีการสร้างเอนไซม์และสร้างองค์ประกอบที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช และสร้างสารที่สามารถใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมหรือทางเกษตรกรรมได้ และมีการศึกษาพบว่าต้นกล้ากะหล่ำปลีที่คลุกเมล็ดด้วยเชื้อรา *Heteroconium chaetospira* ที่ได้จากรากกะหล่ำ มีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ พืชมีความแข็งแรง โดยเชื้อราเอนโดไฟท์ *H. chaetospira* สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นกล้ากะหล่ำ (Narisawaและคณะ,1998) และจากรายงานการศึกษาของ Meganc และ Linda (2008) พบว่าเชื้อราเอนโดไฟท์ *Fusarium* บางชนิด *Nigrospora oryzae*, *Acremonium zeae* และ *Periconia macrospinosa* สามารถกระตุ้นให้ข้าวโพดสร้างสารทุติยภูมิ ที่มีผลทำให้ข้าวโพดมีความต้านทานโรค

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากคะน้าและนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้าในระยะกล้า

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ พลั่วมือ ถุงพลาสติก
2. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ

3. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์ และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์

4. เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด

5. ผ้าขาวบาง กระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)

6. แผ่นพลาสติกสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช

7. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ sterio

8. อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ water agar (WA) และ potato dextrose agar (PDA)

9. สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 75%

10. วัสดุปลูก และกระถางพลาสติก

11. เมล็ดพันธุ์คะน้า

12. ต้นคะน้าปกติที่ไม่มีโรคและแมลงเข้าทำลาย

วิธีการ

1. การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างคะน้าโดยเก็บต้นที่ปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรค ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็น โดไฟท์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนต่างๆ ของต้นคะน้าด้วยโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เพื่อไม่ให้เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อที่เจริญหรือติดบริเวณผิวของส่วนต่างๆเช่น ผิวใบ ซึ่งต้องทดสอบก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืช เพื่อหาระยะเวลา ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นส่วนใบ กิ่ง ลำต้น และรากของต้นสมุนไพรในโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างต้นคะน้าที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด

2. ตัดต้นคะน้าแต่ละส่วนที่จะทำการแยกให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.

3. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 75% เป็นเวลา 15 วินาที

4. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 1, 3 และ 5% ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

5. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ 75% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว

6. นำชิ้นส่วนของพืชวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) โดยแต่ละจานอาหารวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง

7. ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆกัน

1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 1.2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบ ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกกลุ่มของเชื้อรา

1.5 การทดสอบการเจริญของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการเจริญ โดยนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีอัตราการเจริญเร็วที่สุด เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อการเจริญของคะน้าในระยะกล้าต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชในระยะกล้า

2.1 เตรียม suspension ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ โดยใช้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการทดสอบจำนวน 5 ไอโซเลท

2.2 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวเมล็ดคะน้า โดยแช่ในโซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ 1% นาน 1 นาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 ครั้ง จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาแช่ลงใน suspension ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ โดยทำการแช่ทิ้งไว้ก่อนปลูก 24 ชั่วโมง

2.3 ทดสอบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อการงอกของเมล็ดคะน้า นำเมล็ดคะน้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ มาวางเพาะบนกระดาษชื้นในจานอาหาร โดยทำการทดสอบ 4 ซ้ำๆละ 100 เมล็ด หลังจากนั้น 5-7 วัน ทำการวัดผลโดยตรวจจากเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดคะน้าเพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2.4 ทดสอบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อการเจริญของกล้าคะน้า นำเมล็ดคะน้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ปลูกลงในกระบะบรรจุวัสดุเพาะ วางแผนการทดลองแบบ RCB โดยทำการทดลองกรรมวิธีละ 8 ซ้ำ ประเมินผลโดยเปรียบเทียบลักษณะการเจริญ น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา 2 ปี เริ่มต้น เดือนตุลาคม 2552
สิ้นสุด เดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช
โรงเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

เก็บตัวอย่างคะน้าที่ไม่แสดงอาการของโรคจาก 2 พื้นที่ คือ จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากใบและลำต้นของตัวอย่างคะน้าจากจังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดนครปฐม แยกได้ 23 และ 47 ไอโซเลท ตามลำดับ รวม 70 ไอโซเลท เชื้อราที่แยกได้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อราได้เป็น 4 taxa คือ *Alternaria* spp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ Mycelia Sterilia คัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ *Nigrospora*1, *Nigrospora*2, *Nigrospora*3, *Alternaria*1 และ *Alternaria*2

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืชในระยะกล้า

จากการคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญมีอัตราการเจริญเร็วที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลทได้แก่ *Nigrospora* sp. 3 ไอโซเลท (*Nigrospora*1, *Nigrospora*2 และ *Nigrospora*3)และ *Alternaria* sp. 2 ไอโซเลท (*Alternaria*1 และ *Alternaria*2) มาทำการทดสอบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดคะน้า พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 4 ไอโซเลท ยกเว้น *Alternaria*1 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นกล้าคะน้าไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 1)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้าในระยะต้นกล้าเมื่อวัดผลจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของต้นกล้าพบว่า ต้นกล้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ *Nigrospora*1 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์พบว่าคือ *Nigrospora sacchari* แต่ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (ตารางที่ 2 และ 3)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากคะน้าส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่มีรายงานว่าสามารถเป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืช และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพต่อการงอกและการเจริญของคะน้าแม้จะไม่ทำให้พืชเกิดความเสียหาย แต่เชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่ทำการทดสอบ ยังไม่ผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ดังนั้นจึงจะทำการศึกษาโดยแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากพืชอาศัยชนิดอื่นที่อาจจะมีเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช รวมถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืชต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์จากต้นคะน้าปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของโรคและแมลงจำนวน 2 พื้นที่ จาก ตำบลวังขนาย อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี และ ตำบลดอนยายหอม อำเภอเมือง จังหวัดได้เชื้อราจำนวน 70 ไอโซเลท เชื้อราที่แยกได้สามารถจัดกลุ่มของเชื้อราได้เป็น 4 taxa คือ *Alternaria* spp., *Nigrospora* sp., *Pestalotiopsis* sp. และ Mycelia Sterilia

จากการคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญมีอัตราการเจริญเร็วที่สุดจำนวน 5 ไอโซเลท มาทำการทดสอบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดคะน้า พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ 4 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของต้นกล้าคะน้าไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของคะน้าในระยะต้นกล้าพบว่า ต้นกล้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ *Nigrospora*1 มีน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งมากที่สุด เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อราเอ็นโดไฟท์พบว่าคือ *Nigrospora sacchari*

แต่ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์

เอกสารอ้างอิง

Bacon, C.W., Porter, J.K., Robbins, J.D. and Luttrell, E.S. 1977. *Epichloe typhina* from toxic tall fescue grasses. Applied and Environmental Microbiology 34: 576-581.

Chanway, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecology and practical implication. Sydowia 50: 149-170.

Megan Saunders and Linda, M. Kohn. 2008. Host-synthesized secondary compounds influence the in vitro interactions between fungal endophytes of maize. Applied and Environmental Microbiology 74(1): 136-142.

Narisawa, K., Tokumasu, S. and Hashiba, T. 1998. Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*. Plant Pathology 47: 206-210.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดคะน้าที่ปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ชนิดต่างๆ

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์ความงอก[1]
ปลูกด้วย *Nigrospora*1	74.50 ab[2]
ปลูกด้วย *Nigrospora*2	74.00 a
ปลูกด้วย *Nigrospora*3	75.00 ab
ปลูกด้วย *Alternaria*1	74.30 ab
ปลูกด้วย *Alternaria*2	75.30 ab
ชุดควบคุม	75.80 b
CV (%)	1.4 %

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 100 เมล็ด

[2] ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อน้ำหนักสดของกล้าคะน้า

กรรมวิธี	น้ำหนักสด (กรัม)[1]
ปลูกด้วย *Nigrospora*1	2.64 a[2]
ปลูกด้วย *Nigrospora*2	2.21 a
ปลูกด้วย *Nigrospora*3	2.37 a
ปลูกด้วย *Alternaria*1	2.20 a
ปลูกด้วย *Alternaria*2	2.02 a
ชุดควบคุม	2.19 a
CV (%)	28.9 %

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 8 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น

[2] ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ต่อน้ำหนักแห้งของกล้าคะน้า

กรรมวิธี	น้ำหนักแห้ง (กรัม)[1]
ปลูกด้วย *Nigrospora*1	0.43 a[2]
ปลูกด้วย *Nigrospora*2	0.34 a
ปลูกด้วย *Nigrospora*3	0.38 a
ปลูกด้วย *Alternaria*1	0.33 a
ปลูกด้วย *Alternaria*2	0.34 a
ชุดควบคุม	0.39 a
CV (%)	25.4 %

[1] ค่าเฉลี่ยจาก 8 ซ้ำๆ ละ 2 ต้น

[2] ตัวอักษรเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan Multiple Range Test ที่ความเชื่อมั่น 95%

การคัดเลือก และทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล
เพลินพิศ สงสังข์ วงศ์ บุญสืบสกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

คัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จาก Culture collection และแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่เจริญครอบคลุมบริเวณผิวใบหน้าวัว จากแหล่งปลูกต่าง ๆ คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* บนอาหาร Nutrient glucose agar ด้วยเทคนิค paper disc diffusion เลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค โดยเกิดบริเวณยับยั้งเป็นวงใส (clear zone) รัศมีการยับยั้งเป็นบริเวณกว้าง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20w1, 1g7, 20w4, 2g24 และ 772 ทดสอบการควบคุมโรค บนต้นหน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ คือ โรเซตตา และทรอปิคอล ด้วยวิธีการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในสภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 treatment 10 ซ้ำ เปรียบเทียบกับการใช้ *Bacillus* sp. การค้า 1 ชนิด และการทดลองเปรียบเทียบไม่พ่นสาร ผลการควบคุมโรคพบว่าการทดลองที่พ่นด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1G7 และ 1G7+P772 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดี ทำการทดลองซ้ำในปี 2552 โดยทดสอบการควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนหน้าวัวพันธุ์โรซ่า ระหว่างเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนกรกฎาคม หลังการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์แบบสายพันธุ์เดี่ยวและแบบผสมสายพันธุ์ ควบคุมโรคเป็นเวลา 2 เดือน พบว่ากรรมวิธีการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1G7+KA2+20W1 ให้ผลในการควบคุมโรคดีที่สุด รองลงมาคือ 20W1

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-16-49

คำนำ

โรคใบไหม้หน้าวัว เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากการสำรวจในสวนเกษตรกรในพื้นที่ต่าง ๆ ส่วนมากพบอาการเข้าทำลายที่ใบอ่อน ถึงใบกลาง ๆ ของลำต้น อาการเป็นแผลจุดช้ำฉ่ำน้ำ บริเวณใกล้ขอบใบ ที่มีต่อมคายน้ำ ซึ่งเป็นจุดที่เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าทำลายได้ง่าย ทั้งนี้อาการแผลจุดช้ำสังเกตได้ชัดเจนจากด้านใต้ใบหน้าวัว ต่อมาเนื้อเยื่อใบบริเวณที่ถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลายจะเป็นสีเหลือง เมื่อจุดช้ำฉ่ำน้ำเจริญเชื่อมต่อกันทำให้เกิดอาการแผลไหม้จากบริเวณขอบใบ หรือบางครั้งอาจพบอาการไหม้บริเวณกลางใบ เชื้อแบคทีเรียที่เข้าทำลายพืชเจริญเพิ่มปริมาณ แล้วเคลื่อนย้ายไปยังบริเวณท่อลำเลียงของก้านใบพืชและลำต้น โดยเชื้อแบคทีเรียจะไปทำลายเซลล์พืชและอุดตันขัดขวางการเคลื่อนย้ายอาหารและน้ำ ทำให้ต้นหน้าวัวเกิดอาการขาดน้ำ ใบแก่ของหน้าวัวที่อยู่ด้านล่างเนื้อใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ลำต้นหลักของหน้าวัวที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย จะเน่าช้ำเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ทำให้บริเวณจุดเจริญเสียไป ใบหลุดร่วงจากต้นหน้าวัว เมื่อพืชไม่สามารถลำเลียงน้ำและอาหารไปเลี้ยงลำต้นได้ ต้นหน้าวัวจะแสดงอาการเหี่ยวหรือเน่าตายในที่สุด หากจานรองดอกของหน้าวัวที่มีรูปทรงคล้ายหัวใจถูกเชื้อแบคทีเรียเข้าทำลาย เรียกว่าอาการดอกไหม้ นอกจากนี้อาจพบการเข้าทำลายของแบคทีเรียทางปากใบ ทำให้เกิดอาการเป็นจุดวงฉ่ำน้ำรอบแผลเป็นสีน้ำตาล (ปิยรัตน์, 2548; ปิยรัตน์ และคณะ, 2550)

เนื่องจากยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค แนวทางการควบคุมโรคด้วยเชื้อปฏิปักษ์ได้มีการศึกษากันมาบ้าง โดยเสมอใจ และคณะ (2548) ได้ศึกษาการควบคุมโรคไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยชีววิธีในพื้นที่ปลูกภาคใต้ โดยรวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุปลูก ใบพืชที่เป็นโรค และใบพืชปกติ ด้วยวิธี dilution plate บนอาหาร King's B และ Nutrient agar เก็บเชื้อแบคทีเรียไว้ทั้งหมด จำนวน 1,387 ไอโซเลท ทดสอบปฏิกิริยายับยั้งเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* คัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรีย 18 ไอโซเลท จำแนกเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคโดยใช้กลุ่มเชื้อ 3 ไอโซเลท โดยกลุ่มเชื้อ B1128, B1317 และ B1348 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคได้ดีที่สุด โดยจะดำเนินการทดสอบในโรงเรือนต่อไป นอกจากนี้ Fernandez *et al.* (1989) แยกเชื้อจากเนื้อเยื่อด้านในของก้านใบหน้าวัว นำมาทดสอบพบว่า สามารถควบคุมโรคใบไหม้ได้ ต่อมารายงานของ Fernandez *et al.* (1990, 1991) พบว่าการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวยังมีความผันแปรของประสิทธิภาพในการควบคุม ซึ่งต้องมีการวิจัยเพื่อปรับใช้ต่อไป

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่มีการรวบรวมไว้ใน Culture collection และเก็บรวบรวมเชื้อจากแหล่งปลูกหน้าวัวและไม้ดอกไม้ประดับอื่น เพื่อพัฒนาสำหรับควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว

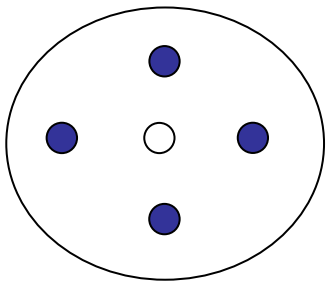
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจาก culture collection จำนวน 67 ไอโซเลท และแยกเก็บเชื้อจากบริเวณผิวใบ และในท่อลำเลียงน้ำอาหารบริเวณก้านใบของหน้าวัวและกล้วยไม้ แยกเก็บเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ด้วยวิธี dilution spread plate บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทบนอาหารเอียงเททับด้วยพาราฟินเหลว

2. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ด้วยวิธี paper disc diffusion โดยผสมเซลล์แขวนลอยเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ในอาหาร NGA โดยใช้เซลล์แขวนลอยเชื้อ 5 มล. เติมลงในอาหาร 200 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับบนจานอาหาร NGA ที่เทรองพื้นไว้บาง ๆ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ประมาณ 2-3 ชั่วโมง) จึงวางกระดาษตาปลาที่หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อ *Bacillus* spp. 5 ไมโครลิตร วางกระดาษตาปลา 4 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ตรงกลางวางกระดาษตาปลาที่หยดน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเป็นการทดลองควบคุม (ภาพแสดงการวางกระดาษตาปลา)



บ่มจานเลี้ยงเชื้อในถุงพลาสติก ในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังการทดสอบ 24, 48, 72 และ หลังการทดสอบ 7 วัน โดยวัดความกว้างรัศมีบริเวณส่วนใส และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางหลังการทดสอบ 7 วัน

3. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

ปี 2551 ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลองโดยใช้หน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ คือ โรเซตตา และทรอปิคอล วางแผนการทดลองแบบ CRD เป็น 10 กรรมวิธี โดยใช้ *Bacillus* sp. ไอโซเลทเดียว และผสม 2 ไอโซเลท โดยเลือกไอโซเลทจาก collection ผสมกับ

Bacillus sp. ที่แยกจากใบหน้าวัว เปรียบเทียบกับการใช้ *Bacillus* sp. การค้า 1 ชนิด และการทดลองเปรียบเทียบไม่พ่นสาร

ปี 2552 ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยใช้หน้าวัว พันธุ์โรซา อายุ 4 เดือน ทดสอบ 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น วางแผนการทดลองแบบ RCB 10 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 1G7

กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 20W1

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA2

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 1G7+KA2

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท 1G7+KA2+20W1

กรรมวิธีที่ 6 พ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA2+KA14+KA16

กรรมวิธีที่ 7 พ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA2+KA16

กรรมวิธีที่ 8 พ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA2+KA14

กรรมวิธีที่ 9 พ่นสารเคมี บอร์โดมิกซ์เจอร์

กรรมวิธีที่ 10 การทดลองเปรียบเทียบพ่นน้ำเปล่า

ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนปลูกพืชทดลอง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพ

ปี 2551 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จาก Culture collection และแยกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่เจริญครอบคลุมบริเวณผิวใบหน้าวัว จากแหล่งปลูกต่าง ๆ จำนวน 68 ไอโซเลท ทำการทดสอบคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ไอโซเลท P139 พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 52 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv.*dieffenbachiae* มีบริเวณส่วนใสกว้างเฉลี่ย 0.05 -0.9 มม. โดยไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้ง ได้แก่ 20W24, Antหางหมู2, 1G7, 20W1, 2G24, 20W4, Ant-an1, P772, 20W17, 20W18

ปี 2552 ทดสอบคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช มีรัศมีการยับยั้งเฉลี่ย 0.4-0.9 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3-2.3 เซนติเมตร (ตารางที่)

3. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

เลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเกิดบริเวณส่วนใสกว้าง 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20W1, 1G7, 20W4, 2G24 และไอโซเลท P772 ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง กรรมวิธีที่พ่นด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 1G7 และ 1G7 +P 772 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ

Fukui *et al.* (1999) แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* จากน้ำ sap ที่อยู่บริเวณท่อลำเลียง และจากน้ำที่พืชคายออกมาจากต่อมคายน้ำ พบว่าการใช้กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากน้ำที่พืชคายออกมาจากต่อมคายน้ำ มีประสิทธิภาพในการควบคุมอาการโรคที่เกิดทางใบได้ ติดตามการเข้าทำลายพืชด้วยสายพันธุ์ bioluminescent พบว่าหลังพ่นเซลล์แขวนลอยของกลุ่มเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถลดความรุนแรง ของการเข้าทำลายจากเชื้อบริเวณต่อมคายน้ำของพืชได้ และเมื่อพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนบาดแผล สามารถยับยั้งการเข้าทำลายพืชทางบาดแผลได้ แต่เมื่อทดสอบการใช้เชื้อแต่ละชนิดเดี่ยว ๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *X. axonopodis* pv.*dieffenbachiae* ได้ Alvarez and Mizumoto (2001) จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไหม้หน้าวัวที่แยกเชื้อจากผิวใบพืช ประกอบด้วย *Sphingomonas chlorophenolica, Microbacterium testaceum, Brevundimonas veslcularis* และ *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* ซึ่งจุลินทรีย์ทั้งสี่ชนิดสามารถมีชีวิตรอดเจริญบนผิวใบพืชได้นานถึงสองเดือน ช่วยปกป้องพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค โดยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกสัปดาห์ พบสามารถควบคุมโรคได้ 75 เปอร์เซ็นต์ Fujii *et al.* (2002) ทดสอบการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เพื่อควบคุมโรคร่วมกับการใช้พันธุ์พืชต้านทานจากการดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าต้นหน้าวัวที่ดัดแปลงพันธุกรรมมีการปลดปล่อยสารเคมีเป็นโปรตีนที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย แต่ไม่มีผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 4 ชนิด โดยเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ช่วยให้ต้นหน้าวัวมีระบบรากที่สมบูรณ์แข็งแรง ต้นพืชแข็งแรง ออกดอกเร็ว ต้นโตสูง จำนวนใบ และขนาดของใบใหญ่ขึ้น ทั้งนี้จากการศึกษารายงานต่าง ๆ การใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์เป็นแนวทางในการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวที่ดีมีประสิทธิภาพ ซึ่งในอนาคตจะผลิตเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมโรค

สรุป

พบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ได้ดี มีเส้นผ่านศูนย์กลางความกว้างของส่วนใสบริเวณยับยั้งเฉลี่ย 1.5-2.5 เซนติเมตร จำนวน 10 ไอโซเลท คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (ภาพที่ 1) จากแหล่งปลูกต่างกัน 3 แหล่ง เลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเกิดบริเวณส่วนใสกว้าง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20W1, 1G7, 20W4, 2G24 เป็นเชื้อแบคทีเรียจาก culture collection และ P772 แยกจากใบหน้าวัว (ยังไม่ได้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์) ทดสอบการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลองโดยใช้หน้าวัวพันธุ์อ่อนแอ 2 พันธุ์ พบว่าการทดลองที่พ่นด้วย *Bacillus* sp. ทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง สายพันธุ์ 1G7 ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด โดยมีความรุนแรงของการเกิดโรคต่ำสุด เท่ากับ 2.3 รองลงมาคือ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ 2G24 และ 20W1 ความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากัน คือ 2.6 โดยการทดลองเปรียบเทียบมีความรุนแรงในการเกิดโรคในระดับ 3.2 (ภาพที่ 2) การทดลองควบคุมโรคในปี 2552 พบว่าพบว่ากรรมวิธีการพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ 1G7+KA2+20W1 ให้ผลในการควบคุมโรคดีที่สุด รองลงมาคือ 20W1 สำหรับการพ่นสารเคมีพบอาการเป็นพิษต่อพืช

เอกสารอ้างอิง

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2548. โรคใบไหม้!! ปัญหาใหญ่ของหน้าวัว. ข่าวอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. ปีที่ 1 ฉบับที่ 7 กันยายน 2548. หน้า 2.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2550. สำรวจ รวบรวม จำแนกและประเมินความรุนแรงของแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* สาเหตุโรคใบไหม้หน้าวัว. ผลงานวิจัยเรื่องเต็มการประชุม สัมมนาวิชาการอารักขาพืชเพื่อการผลิตสู้วิกฤตโลกร้อน. 21-23 สิงหาคม 2550.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันต์ เพชรรัตน์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2548. การประเมินการควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์. รายงานก้าวหน้า การประเมินผลศัตรูธรรมชาติของแมลงศัตรูพืช และวัชพืชทางการเกษตรและสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศไทย. http://conf.agi.nu.ac.th/nhc7/upload/abstract/abstract%20หน้าวัว1.doc (15-11-2551)

Alvarez, A. and C. Mizumoto. 2001. Bioprotection and stimulation of aroids with phylloplane bacteria. Phytopathology. 91:S3.

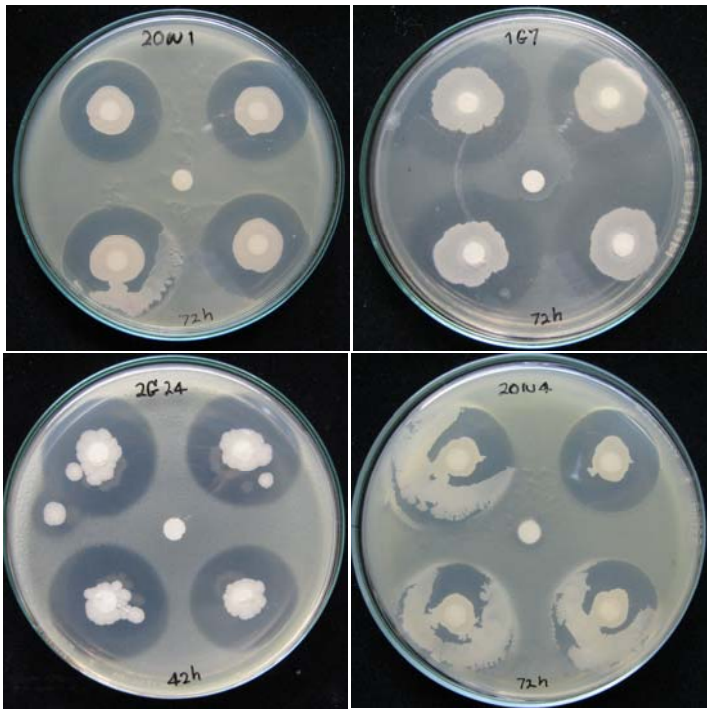
Fernandez, J. A., M. J. Tanabe, P. Moriyasu and B. Duffy. 1989. Biological control. Pages 27-29 in: Proc. Anthurium Blight Conf., 2nd. J.A. Fernandez and T. Nishijima, eds. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res., University of Hawaii, Honolulu.

Fernandez, J. A., M. J. Tanabe, P. Moriyasu and W. J. Wolff. 1990. Biological control. Pages 41-43 in: Proc. Anthurium Blight Conf., 3rd. A. M. Alvarez, ed. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res., University of Hawaii, Honolulu.

Fernandez, J. A., M. J. Tanabe, W. J. Wolff and P. Moriyasu. 1991. Biological control. Pages 28-30 in: Proc. Anthurium Blight Conf., 4th. A. M. Alvarez, D. C. Deardorff, and K. B. Wadsworth, eds. Hawaii Inst. Trop. Agric. Human Res., University of Hawaii, Honolulu.

Fukui, R., H. Fukui and A. M. Alvarez. 1999a. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight. Phytopathology. 89:366-373.

Fukui, R., H. Fukui and A. M. Alvarez. 1999b. Suppression of bacterial blight by a community isolated from the futtation fluids of anthuriums. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1020-1028.



ภาพที่ 1 บริเวณวงใส (clear zone) จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

(ก) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 20W1

(ข) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 1G7

(ค) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 2G24

(ง) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 20W4

ภาพที่ 2 ผลการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัว ด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

(ก) การทดลองเปรียบเทียบ

(ข) แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท 1G7

(ค) แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท 20W4

(ง) แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไอโซเลท 20W1

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพรัศมีบริเวณใสการยับยั้งของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ต่อเชื้อ *X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*

แบคทีเรียปฏิปักษ์	รัศมีบริเวณใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (เซนติเมตร)
1G7	0.9	2.3
20W1	0.9	2.3
KA2	1.0	2.5
20W4	0.8	2.1
2G24	0.8	2.1
SA8	0.6	1.7
PA12	0.7	1.9
KA14	0.6	1.7
KA16	0.9	2.3

หมายเหตุ: รัศมีบริเวณใส วัดหลังการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เส้นผ่านศูนย์กลาง วัดหลังการบ่มเชื้อ 5 วัน

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบการควบคุมโรคใบไหม้หน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

แบคทีเรียปฏิปักษ์	% Incidence			Severity		
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
Control	60	40	60	1.8	0.8	1.6
1G7	80	60	60	1.8	0.6	1.2
20W1	60	40	60	1.4	0.6	1.2
KA2	80	60	60	1.8	0.8	1.8
1G7+KA2	80	60	60	1.6	1.6	1.2
1G7+KA2+20W1	60	80	20	1.2	1.6	0.4
KA2+KA14+KA16	80	60	60	1.6	1.5	1.2
KA2+KA16	60	60	60	1.4	1.4	1.0
KA2+KA14	100	60	60	1.6	1.2	1.2
บอร์โดมิกซ์เจอร์	80	40	60	1.0	0.6	0.6

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ๆ ละ 5 ต้น; Incidence นับจำนวนต้นที่เกิดโรค/จำนวนต้นทั้งหมด คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ;Severity ให้คะแนนความรุนแรงในการเกิดโรค 0, ไม่เกิดโรค; 1, เกิดโรค 1-10%, 2 เกิดโรค 11-25%

ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora*

Study on preservation technique of *Erwinia carotovora*

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล ดารุณี ปุญญพิทักษ์ สุรีย์พร บัวอาจ

1/ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

นำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีกลมตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว สีขาวขุ่น มีคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) มาทดสอบวิธีการเก็บรักษาวิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี โดยมีวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียและความบริสุทธิ์ ทุก 3 เดือน บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บไว้ด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 8 วิธีเป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ ทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

รหัสโครงการ 09-02-49-02-01-07-01-51

คำนำ

วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชมีหลายวิธีการ ได้แก่ การเก็บรักษาไว้ภายใต้น้ำมัน (Zensen et al. 1944, และ Graham, 1952) วิธีเก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเก็บไว้ได้นาน 2-3 ปี (Devay et al. 1963, Kelman and Person, 1961) เก็บด้วยวิธี 15 % glycerol ใน Deep freezing (Quadling, 1960, Sleemsman and Leben, 1978) วิธีการนี้ส่วนใหญ่ใช้ในเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช Quadling (1960) ได้รายงานสามารถเก็บรักษาเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *phascoli* และ *Erwinia* spp และ *Pseudomonas* spp. ไว้ได้นาน 18 เดือนที่อุณหภูมิ –200C Sleesman and Leben (1978) รายงานการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้ 2 ถึง 3 ปีที่อุณหภูมิ –70^{0}C และวิธี Lyophilization เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการเก็บระยะยาว (long-term preservation) (Dhimgra and Simclair, 1985) ได้มีรายงานวิธีการ Lyophilization สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้เป็นระยะเวลามากกว่า 10 ปี (Proom and Hemmon, 1949, Stark and Herrington, 1931)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

3.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

ทดสอบวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* วิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี ทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 เก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 2 เก็บไว้ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ10 °C

กรรมวิธีที่ 3 เก็บภายใต้น้ำมัน ที่อุณหภูมิห้อง

กรรมวิธีที่ 4 เก็บภายใต้น้ำมัน ที่อุณหภูมิ10 °C

กรรมวิธีที่ 5 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 20 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 10 %

กรรมวิธีที่ 6 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 20 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 50 %

กรรมวิธีที่ 7 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 80 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 10 %

กรรมวิธีที่ 8 เก็บภายใต้เหยือกแข็ง – 80 °C โดยเติมสาร glycerol จำนวน 50 %

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย ดำเนินการตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์เชื้อ *Erwinia carotovora* จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากพืชตระกูลกระหล่ำ และตระกูลผักกาด

2. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato semisynthetic agar (PSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอายุ 48 ชั่วโมง

3. เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆตามกรรมวิธีทดลอง

4. ตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบในทุกๆกรรมวิธี ทุก 3 เดือน โดยในกรรมวิธีที่เก็บภายใต้เหยือกแข็งเมื่อนำออกมาต้องแช่ในน้ำแข็งไว้ตลอดเพื่อให้อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงฉับพลัน ค่อยๆเย็นลง

5. บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี

เวลาและสถานที่

ต.ค.50 – ก.ย.53 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

นำเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท ที่มีลักษณะโคโลนีกลมตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว สีขาวขุ่น มีคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) มาทดสอบวิธีการเก็บรักษาวิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี โดยมีวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 8 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของเชื้อแบคทีเรียและความบริสุทธิ์ ทุก 3 เดือน บันทึกลักษณะโคโลนี ความมีชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย และอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท เก็บไว้ด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 8 วิธีเป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ ทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Erwinia carotovora* จำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาวิธีการเก็บรักษาวิธีต่างๆ จำนวน 8 วิธี พบว่า เก็บไว้ด้วยวิธีต่างๆ ทั้ง 8 วิธีเป็นเวลา 24 เดือนยังคงมีชีวิตอยู่ทั้ง 10 ไอโซเลทที่มีลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงตามเดิมทุกประการ

เอกสารอ้างอิง

Correll, J.C., J.E. Puhalla, and R.W. Schneider. 1986. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the Basis of Colony Size, Virulence, and Vegetative Compatibility. Phytopathology. 76 (4) : 396-400.

Goldie-Smith, E.K.1956. Maintenance of stock Cultures of aquatic fungi. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society.72:158-166.

Manoch, L., and S. Piriyaprin. 1993. Isolating fungi from soil and other organic materials. pp. 69-89. *In* Application of Soil Microorganism in Planting Stock Production. Training Course Proceeding No. 3. Muak-Lek, Saraburi, Thailand.

Marx, D.H. and W.J. Daniel. 1976. Maintaining cultures of Ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile cold water storage. Can. J. Microbiol. 22:338 – 341.

Smith, S. and Agies H.S. Onions. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Commonwealth Mycological Institute,. Furry Lane Kew, Richmond, Serrey, England. 51 p. No. 54, 53-57.

Smith, D. 1988. Culture and Preservation. *In* Filamentous Fungi, Living Resource Biotechnology, ed. D.L.Hawksworth and B.E. Kirsop, pp. 75-99. Cambridge University Press, UK.

Tolley P.W., 1993. Simple Liquid Nitrogen Storage Method update for *Phytophthora* species. *Phytophthora* New letler19 (13).

Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi* and Disease It cause, Monograph No.10, The American *Phytopathological* Socicty, Minnesota. 96 p.

ศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง

Studies on Preservation Technique of Entomopathogenic Nematodes

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 และ *Heterorhabditis* sp. PRh isolate ให้คงความมีชีวิตและคงศักยภาพในการกำจัดแมลง ในสารอุ้มความชื้นชนิดต่างๆ โดย *Steinernema* sp. KPs No.2 เก็บรักษาในขี้เลื่อย ขี้เลื่อยปนดินทราย ขี้เลื่อยปนโพลิเมอร์ ดินพีทก้อนฟองน้ำตัด โพลิเมอร์ และน้ำกลั่น จำนวน 5 ล้านตัวต่อถุง นำมาตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27$\pm$2°ซ) ทุกๆ 1 เดือน พบว่า การเก็บรักษาในสารโพลิเมอร์ สามารถรักษาสภาพของไส้เดือนฝอยได้นานกว่าสารอุ้มความชื้นชนิดอื่นๆ โดยมีระยะการเก็บนาน 3 เดือน พบเปอร์เซ็นต์การตายเพียง 11 % รองลงมาคือ ขี้เลื่อยปนโพลิเมอร์ พบการตาย 15 % ที่ระยะเวลา 3 เดือน แต่การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในก้อนฟองน้ำพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยเพิ่มขึ้นตั้งแต่เดือนที่ 1 2 และ 3 หรือเท่ากับ 18 46 และ 74 % ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 ที่เก็บรักษาในสารโพลิเมอร์เป็นระยะเวลา 3 4 และ 5 เดือน ในการกำจัดแมลงทดสอบ (หนอนกินไขผึ้ง) พบว่ามีศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบตายเท่ากับ 95 80 และ 60 % ตามลำดับ สำหรับการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. PRh ในวัสดุเก็บรักษา 5 ชนิด คือ โพลิเมอร์ ขี้เลื่อย ก้อนฟองน้ำ ดินทราย และน้ำกลั่น จำนวน 1 ล้านตัวต่อภาชนะๆ ละ 10 ซ้ำ และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายทุก 1 เดือน พบว่าเดือนที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 14 22 46 48 และ 16 เปอร์เซ็นต์ เดือนที่ 2 เท่ากับ 17 25 50 56 และ 21 เปอร์เซ็นต์ และเดือนที่ 3 เท่ากับ 34 48 62 84 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ของการเก็บรักษาในโพลิเมอร์ ขี้เลื่อย ก้อนฟองน้ำ ดินทราย และน้ำกลั่น ตามลำดับ เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาในวัสดุเก็บรักษาชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน มาทดสอบศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบ (*Galleria mellonella*) พบว่าไส้เดือนฝอยมีศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบตายเท่ากับ 90 75 40 5 และ 65 % ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 09-02-49-01

คำนำ

ไส้เดือนฝอยในวงศ์ Steinernematidae เรียกชื่อสามัญ (common name) ว่า steinernematid ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1923 โดย Steiner ในประเทศเยอรมัน ได้มีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยชนิดนี้เป็นเวลามากกว่า 80 ปี ซึ่งพบว่าไส้เดือนฝอยมีแบคทีเรียแกรมลบในวงศ์ Enterobacterio-ceae สกุล *Xenorhabdus* sp. อยู่ร่วมกันในลักษณะพึ่งพาอาศัยหรือเรียกว่า symbiosis โดยเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) ไส้เดือนฝอยเป็นตัวพาแบคทีเรียเข้าสู่ตัวแมลง โดยผ่านทางช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ทางปาก ช่องขับถ่าย และรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) จากนั้นเข้าสู่ช่องว่างภายในตัวแมลง (haemocoel) ซึ่งมีน้ำเลือด (haemolymph) ไส้เดือนฝอยจะปลดปล่อยแบคทีเรียสู่กระแสเลือดแมลง และร่วมกันสร้างสารพิษ (toxin) ทำให้แมลงเกิดภาวะเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. เซลล์ของแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณในน้ำเลือดของแมลง และไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตโดยใช้เซลล์ของแบคทีเรียในการขยายพันธุ์ ซึ่งเป็นแบบจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เรียกการผสมพันธุ์แบบนี้ว่า amphimictic ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตอยู่ภายในแมลงที่ตายแล้วประมาณ 2-3 ชั่วอายุ (generation) ขึ้นอยู่กับขนาดของแมลง เมื่อแมลงเริ่มแห้งเป็นซาก (cadaver) ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile) จะสะสมอาหารสำรอง (food reserve) ประเภทไขมันสะสม (lipid stroage) บริเวณเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างผิวหนังกับกล้ามเนื้อช่องท้อง (hypodermal chord) และดูดกลืนเซลล์แบคทีเรียเก็บไว้ในช่อง lumen ของลำไส้ส่วนหน้า และเคลื่อนตัวออกจากซากของแมลงเพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ต่อไป (Akhurst and Boemare, 1990)

ความสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย (nematode-bacterium complex) ได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ ที่จะพัฒนาศัตรูธรรมชาติของแมลงชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้กำจัดแมลงระยะตัวหนอนที่เป็นศัตรูสำคัญในพืช จึงมีการศึกษาและพัฒนาไส้เดือนฝอยในกลุ่มนี้ตั้งแต่เริ่มค้นพบครั้งแรกจนถึงปัจจุบัน มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมชนิดต่างๆ (artificial media) ได้สำเร็จตั้งแต่ปี ค.ศ. 1931 โดย Glaser ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ axenic culture ที่ไม่มีเซลล์ของ symbiotic bacteria ร่วมด้วย ต่อมามีการพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเป็นแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย (Bedding, 1981) ซึ่งให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าแบบเดิม นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยยังได้รับการรับรองจาก EPA ถึงความปลอดภัยต่อพืช สัตว์เลือดอุ่นและมนุษย์ รวมทั้งปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม (Gaugler and Kaya, 1990) ไส้เดือนฝอยจึงได้รับความสนใจอย่าง

กว้างขวางทั่วโลก ที่จะพัฒนาให้นำมาใช้ประโยชน์เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) และไวรัส NPV (nuclear polyhedrosis virus) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูสำคัญต่างๆ โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชในพื้นที่ทำการเกษตร เป็นการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี (biological control agent) เพื่อช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและสภาพแวดล้อม

นอกจากนั้น นักวิจัยยังให้ความสำคัญในการค้นหาชนิดและสายพันธุ์ใหม่ๆ ในเขตต่างๆ ทั่วโลก ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย เอเชีย และบางประเทศในแอฟริกา เพื่อได้สายพันธุ์พื้นเมืองหลากหลายชนิด และศึกษาการกระจายตัวของไส้เดือนฝอยในธรรมชาติของถิ่นที่อยู่ จากรายงานการกระจายตัวของไส้เดือนฝอย steinernematid ในภูมิภาคต่างๆ พบว่าในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีปยุโรป ได้แก่ สาธารณรัฐเชคโกสโลวาเกีย 36.8 % สวีเดน 25 % ฟินแลนด์ 5.8 % สาธารณรัฐไอร์แลนด์ 10.4 % นอร์เวย์ 18.3 % และสวิสเซอร์แลนด์ 26.5 % ในทวีปอเมริกามีการศึกษาการกระจายตัวและรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และเปอร์โตริโก และใน 3 ประเทศของอเมริกาใต้คือ บราซิล อุรุกวัย และอาร์เจนตินา นอกจากนั้นยังมีรายงานในประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย รายงานใน 9 ประเทศ คือ ญี่ปุ่น จีน อินเดีย ศรีลังกา เกาหลี โอมาน มาเลเซีย เวียตนาม และไทย ในทวีปแอฟริกาได้รายงานการสำรวจค้นพบในประเทศเคนยาในปัจจุบันไส้เดือนฝอยมีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้กำจัดแมลงหลายชนิด โดยเฉพาะแมลงศัตรูสำคัญในพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ กลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ (order) Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้ผัก (common leafworm, *Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *S. exigua*) และหนอน เจาะสมอฝ้าย (American bollworm, *Heliothis armigera*) กลุ่มหนอนด้วงในอันดับ Coleptera เช่น ด้วงหมัดกระโดด (flea betle, *Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วง Japanese beetle และด้วงงวงองุ่น (vine weevil, *Otiorhynchus sulcatus*) เป็นต้น ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย steinernematid นำมาผลิตเป็นการค้า 6 ชนิด คือ *S. carpocapsae, S. glaseri, S. feltiae, S. riobrave, S. scapterisci* และ *S. kushidai* ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายทั่วโลกมากกว่า 40 บริษัท ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย ได้แก่ บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil)

ปัจจุบันไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* spp.จำแนกได้ 26 ชนิดคือ *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 & Doucet, 1990; *S. scapterisci* Nguyen & Smart, 1990; *S. caudatum* Xu *et al.,* 1991; *S. neocurtillae* Nguyen & Smart, 1992 b; *S. longicaudum* Shen, 1992; *S. cubanum* Mracek *et al.,* 1994; *S. puertoricense* Roman & Figueroa, 1994; *S. riobrave* Cabanillas *et al.,* 1994; *S. bicornutum* Tallosi *et al.,* 1995; *S. oregonense* Liu & Berry, 1996; *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; *S. tami* Luc *et al.,* 2000 และ *S. thailandense* Tangchitsomkid, 2001 (นุชนารถ, 2544)

ในสกุล *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 (นุชนารถ, 2544)

การค้นหาไส้เดือนฝอยที่มีประโยชน์จากธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ซึ่งดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำมาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อนำสายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae จำนวน 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KB) พิจิตร (PC) อยุธยา (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) และสระแก้ว (SK) และ family Heterorhabditidae จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (RE) นำมาเก็บรวบรวมเป็น culture collection ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ, 2543)

ไส้เดือนฝอย order Rhabditida (family Steinernematidae และ Heterorhabditidae) จัดเป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง ที่ได้รับความสนใจในการพัฒนานำไปใช้ประโยชน์โดยเฉพาะใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชทางการเกษตรเพื่อลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช ซึ่งในปัจจุบันขยายผลเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายเป็นการค้าแพร่หลายทั่วโลก ดังนั้น การอนุรักษ์เก็บรักษาและ

คัดเลือกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อนำไปสู่การวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืช จึงเป็นงานวิจัยที่สามารถนำไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์จากผลงานได้อย่างเป็นรูปธรรม งานวิจัยมุ่งเน้นการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยแต่ละไอโซเลทให้มีชีวิตและคงศักยภาพในการเป็น bio-agent กำจัดศัตรูพืช เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 แยกได้จากดินในพื้นที่ จ.กำแพงเพชร และไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. PRh แยกได้จากดินในพื้นที่ จ.เพชรบุรี
2. หนอนกินรังผึ้งที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ
3. สารอุ้มความชื้น ได้แก่ ฟองน้ำ โพลิเมอร์ ขี้เลื่อย ดินทราย ดินพีท และน้ำกลั่น
4. วัสดุ-อุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย

วิธีการ

1. ทำการเก็บไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 ในสารอุ้มความชื้นชนิดต่างๆ คือ ขี้เลื่อย ขี้เลื่อยปนดินทราย ขี้เลื่อยปนโพลิเมอร์ ดินพีท ก้อนฟองน้ำตัดขนาด 1x1x1 ซม. โพลิเมอร์ และน้ำกลั่น จำนวน 5 ล้านตัวต่อถุง ชนิดละ 15 ซ้ำ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm2^{\circ}$ซ) จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยทุกๆ 1 เดือน เดือนละ 3 ซ้ำ เป็นเวลา 5 เดือน คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย และไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตนำมาทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลงทดสอบ (หนอนกินรังผึ้ง) คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงทดสอบ

2. ทำการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. PRh ในวัสดุเก็บรักษา 5 ชนิด คือ โพลิเมอร์ ขี้เลื่อย ก้อนฟองน้ำ ดินทราย และน้ำกลั่น จำนวน 1 ล้านตัวต่อภาชนะๆ ละ 10 ซ้ำ และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายทุก 1 เดือน คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย และไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตนำมาทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลงทดสอบ (หนอนกินรังผึ้ง) คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงทดสอบ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2549 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2

ผลการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 ในสารอุ้มความชื้นชนิดต่างๆ คือ ขี้เลื่อย ขี้เลื่อยปนดินทราย ขี้เลื่อยปนโพลิเมอร์ ดินพีท ก้อนฟองน้ำตัด โพลิเมอร์ และน้ำกลั่น จำนวน 5 ล้านตัวต่อถุง นำมาตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ($27\pm2^{\circ}$ซ) ทุกๆ 1 เดือน พบว่าการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในสารโพลิเมอร์ และขี้เลื่อยผสมสารโพลิเมอร์ สามารถคงความมีชีวิตของไส้เดือนฝอยได้นานที่สุด โดยการเก็บเป็นระยะเวลา 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 11 และ 15 % ตามลำดับ และเมื่อเก็บที่ระยะเวลา 4 เดือน ไส้เดือนฝอยที่เก็บในสารโพลิเมอร์ยังคงรอดชีวิตเท่ากับ 70 % เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในก้อนฟองน้ำสังเคราะห์ และขี้เลื่อยปนดินทราย พบว่าไส้เดือนฝอยมีการตายเท่ากับ 46 และ 32 % ตามลำดับ ในเวลาการเก็บเพียง 2 เดือน และเก็บระยะเวลานาน 3 เดือน ตายมากกว่า 50 % ของสารทั้งสองชนิด สำหรับการเก็บรักษาในดินพีทพบว่า เก็บได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 22 % แต่อย่างไรก็ตาม การนำดินพีทมาใช้เป็นวัสดุหรือสารเก็บรักษาไส้เดือนฝอย ควรต้องนึ่งฆ่าเชื้อก่อนเพื่อควบคุมจุลินทรีย์หรือไส้เดือนฝอยชนิดอื่นๆ ปนเปื้อนได้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 ที่เก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นชนิดต่างๆ ในแต่ละเดือน รวม 5 เดือน

ชนิดสารอุ้มความชื้น	% การตายของไส้เดือนฝอยในช่วงระยะเวลาการเก็บ (เดือน)				
	1	2	3	4	5
1. ขี้เลื่อย	12	22	42	76	100
2. ขี้เลื่อยปนทราย	16	32	56	80	100
3. ขี้เลื่อยปนโพลิเมอร์	5	7	15	36	52
4. ดินพีท	6	10	22	48	78
5. ก้อนฟองน้ำตัด	18	46	74	100	-
6. โพลิเมอร์	2	5	11	30	47
7. น้ำกลั่น	1	8	35	55	62

ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

เมื่อทำการทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 ที่เก็บรักษาในสารโพลิเมอร์เป็นระยะเวลา 3 4 และ 5 เดือน ในการกำจัดแมลงทดสอบ (หนอนกินไขผึ้ง) พบว่ามีศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบตายเท่ากับ 95 80 และ 60 % ตามลำดับ

2. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. PRh

ผลการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. PRh ในวัสดุเก็บรักษา 5 ชนิด คือ โพลิเมอร์ ขี้เลื่อย ก้อนฟองน้ำ ดินทราย และน้ำกลั่น จำนวน 1 ล้านตัวต่อภาชนะๆ ละ 10 ซ้ำ และตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายทุก 1 เดือน พบว่าเดือนที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 14 22 46 48 และ 16 เปอร์เซ็นต์ เดือนที่ 2 เท่ากับ 17 25 50 56 และ 21 เปอร์เซ็นต์ และเดือนที่ 3 เท่ากับ 34 48 62 84 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ของการเก็บรักษาในโพลิเมอร์ ขี้เลื่อย ก้อนฟองน้ำ ดินทราย และน้ำกลั่น ตามลำดับ

เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาในวัสดุเก็บรักษาชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 เดือน มาทดสอบศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบ (*Galleria mellonella*) พบว่า ไส้เดือนฝอยมีศักยภาพในการฆ่าหนอนทดสอบตายเท่ากับ 90 75 40 5 และ 65 % ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 และ *Heterorhabditis* sp. PRh ให้คงความมีชีวิตและคงศักยภาพในการกำจัดแมลงดีที่สุดคือ การเก็บรักษาในสารโพลิเมอร์ สามารถรักษาสภาพของไส้เดือนฝอยได้นานกว่าสารอุ้มความชื้นชนิดอื่นๆ โดยมีระยะการเก็บนาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 11 และ 34 % ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบศักยภาพในการกำจัดแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. KPs No.2 ที่เก็บรักษาในสารโพลิเมอร์เป็นระยะเวลา 3 4 และ 5 เดือน พบว่ามีศักยภาพในการฆ่าหนอนกินไขผึ้งตาย เท่ากับ 95 80 และ 60 % ตามลำดับ และ *Heterorhabditis* sp. PRh ที่เก็บรักษาในสารโพลิเมอร์เป็นเวลา 3 เดือน พบว่ามีศักยภาพในการฆ่าหนอนกินไขผึ้งตาย เท่ากับ 90 %

เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2543. ไส้เดือนฝอยที่มีประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช, น. 223-246. *ใน* พัฒนาการเกษตรไทยยุคเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2544. อนุกรมวิธานไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง STEINERNEMATID. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 63 หน้า.

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.

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.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. *Science* 614.

Gaugler, R. and H.K. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida. 365 p.

สำรวจ รวบรวมและจำแนกราเขม่าดำ

Surveying,Collecting and Identification of the Smut Fungi

พรพิมล อธิปัญญาคม[1] พจนา ตระกูลสุขรัตน์[1] ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช[2]
[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

สำรวจ รวบรวมราเขม่าดำ ได้ราเขม่าดำทั้งหมดจำนวน 145 ตัวอย่าง จากจังหวัดต่าง ๆ ระหว่างเดือนตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2551 จำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา จำแนกชนิดได้ราเขม่าดำได้ 13 genera 66 species และ unidentified species 1 ชนิด ส่วนใหญ่ราเขม่าดำที่พบยังไม่มีรายงานในประเทศไทย และจากการสำรวจรวบรวมราเขม่าดำครั้งนี้พบราเขม่าดำชนิดใหม่ที่จำนวนทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ *Macalpinomyces siamensis* บน *Coelorachis striata* พบที่อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ *Sporisorium clandestinum* บน *Aristida setacea* ที่อำเภอนาคู จังหวัดกาฬสินธุ์ *S. likhitekarajae* บน *Ischemum* sp. ที่อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม *S. pseudosorghi* บน *Pseudosorghum pseudosorghi* ที่เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคอนสาน จังหวัดชัยภูมิ *S. trispicatae* บน *Eulalia trispicata* ที่เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ *Tilletia chiangmaiensis* บน *Arundinella bengalensis* ที่อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ *T. isachneicola* บน *Isachne globosa* ที่อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา *T. filisora* บน *Pennisetum setosum* พบ 3 แหล่ง ได้แก่ เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคอนสาน จังหวัดชัยภูมิ อำเภอนครไทย และ อำเภอ วังทอง จังหวัดพิษณุโลก, *T. lageniformis* บน *Hyparrhenia rufa* พบ 2 แหล่ง ได้แก่ เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง และ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ *T. setariae-parviforae* บน *Setaria parviflora* ที่อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร *T. thailandica* บน *Eragrostis amabilis* ที่อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย และ *Yelsemia droserae* บน *Drosera burmanni* เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ที่อำเภอโนนคูณ จังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างแห้งของราเขม่าดำเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-23-51

คำนำ

ราเขม่าดำ (Smut fungi) จัดอยู่ใน Order Ustilaginales Class Basidiomycetes ทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด แพร่กระจายอยู่ทั่ว ราเขม่าดำมักเข้าทำลายรังไข่ของเมล็ดธัญญพืชและหญ้า รวมทั้งเข้าทำลายผล แต่ก็มีราเขม่าดำหลายชนิดที่ทำลายใบ ลำต้น และส่วนของดอก (Agrios, 2005)

ราเขม่าดำ หรือ smut fungi เป็นราสาเหตุโรคพืชที่เป็น basidiomycetous microfungi สร้าง teliospores พบโดยทั่วไปมีอยู่ประมาณ 77 genera 1,450 species ประมาณ 53% ทำลายพืชตระกูลหญ้าและธัญญพืช และอีก 14% ทำลายพืชตระกูล

Cyperaceae มีพืชอาศัยประมาณ 4,100 ชนิด ราเขม่าดำส่วนใหญ่มีพืชอาศัยจำเพาะ พืชที่ถูกทำลายมีลักษณะแคระแกร็นและเกิดความเสียหายของเมล็ดพืช ราสร้างสปอร์เป็นกลุ่มผงสีดำใน sorus บนส่วนของพืชที่เป็นโรค เช่นที่ รังไข่ เกสรตัวผู้ ช่อดอก ลำต้น ใบ และเมล็ด ราเขม่าดำบางชนิดเช่น *Entorrhiza* สร้าง gall บนรากพืช (McKenzie and Vánky, 2001)

โรคเขม่าดำ (smut disease) ทำความเสียหายแก่ธัญญพืชชนิดต่าง ๆ มาก พบได้ทั่วไป เข้าทำลายเมล็ด มีผงสปอร์สีดำอยู่ภายในเมล็ด ทำให้ผลผลิตและคุณภาพลดลง เชื้อราสาเหตุโรคที่พบทั่วไป ลักษณะสำคัญคือการรวมกันของ compatible spores หรือเส้นใย ราสร้าง teliospores ได้แก่ genera *Ustilago* ทำให้กิดโรคราเขม่าดำของข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และอื่น ๆ *Tilletia* หลาย species ทำให้เกิดโรค bunt หรือ stinking smut ของข้าวสาลี *Sphacelotheca* หลาย species ทำให้เกิดโรคเขม่าดำของข้าวฟ่าง (loose smut of sorghum) *Neovossia* และ *Entyloma* เชื้อราเข้าทำลายเมล็ดตั้งแต่ในช่วงรังไข่ แล้วเจริญพร้อมกับการเกิดของเมล็ด ทำให้ทั้งผลและเมล็ดและผลเป็นโรค บางชนิดทำลายใบ ลำต้น และช่อดอก บางชนิดเข้าทำลายเมล็ดตั้งแต่ยังไม่โผล่จากดิน หรือระยะต้นกล้าแล้วเมื่อต้นพืชเจริญ ก็ทำลายช่อดอกด้วย แต่บางชนิดทำลายพืชเฉพาะแห่ง เช่น ที่ใบ ลำต้น ทำให้เซลล์ที่มีเชื้ออยู่เต็มไปด้วยผงสปอร์ มีการบวมโตเนื่องจากเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นเพราะผงสปอร์ พืชอาจตายและแคระแกรนได้

ราเขม่าดำจัดเป็นราที่มีความสำคัญเช่นเดียวกับราสนิม หรือ rust fungi พืชอาศัยของราเขม่าดำ ได้แก่ Angiosperm โดยเฉพาะพืชใน family Cyperaceae และ Gramineae และสามารถเข้าทำลายพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายชนิดเช่น อ้อย ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น Basidiospore ของราเขม่าดำ เมื่องอกให้กำเนิด primary mycelium ซึ่งเป็น monokaryotic ระยะที่เป็น primary mycelium นี้สั้นมาก ชีพจักรส่วนใหญ่ของราจึงมีเส้นใยเป็น secondary mycelium (N+N) ซึ่งเจริญอยู่ในเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของ meristem แม้ว่าราเขม่าดำจะพบเป็น parasite บนส่วนของพืชที่มีชีวิต แต่ก็มีหลาย species ที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ โดยการเป็น

saprobe ในดิน และบางพวกอาจนำมาเลี้ยงและเจริญจนครบชีพจักรได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิจัย, 2546)

สำหรับในประเทศไทยนั้นมีการศึกษาราเขม่าดำบนข้าวโพด (Panichsukpatana and Boon-long, 2002) อ้อย (Ouvanich , 2002) เดือย Titatarn *et al.,* 1983) ยังไม่ค่อยมีการศึกษาราเขม่าดำบนพืชอาศัยอื่น ๆ เช่นพืชตระกูลหญ้า ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้เป็นการสำรวจและจำแนกชนิดราเขม่าดำบนพืชตระกูล Cyperacaea ในประเทศไทยทำให้ทราบชนิดของราและพบว่ายังมีราเขม่าดำอีกหลายชนิดมากที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทยและบางชนิดยังไม่มีรายงานในประเทศอื่นด้วย ดังนั้นการสำรวจ ศึกษาการรวบรวม และจำแนกชนิดของราเขม่าดำนี้จึงมีความสำคัญเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น อ้อย เพื่อต้านทานโรคเขม่าดำ และเนื่องจากราเขม่าดำในแต่ละพืช หรือพืชเดียวกัน จะมีความหลากหลายของเชื้อ เพราะฉะนั้นการจำแนกชนิดเชื้อราเขม่าดำนั้นมีประโยชน์เพื่อเป็นฐานข้อมูล การเก็บตัวอย่างแห้งไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบในการตรวจเมล็ดพันธุ์พืชนำเข้า ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในงานกักกันพืช ตลอดจนเป็นพื้นฐานในการศึกษาจำแนกอนุกรมวิธานราดำของพืชต่าง ๆ ในประเทศไทยเพื่อสร้างนักอนุกรมวิธานทางด้านราสาเหตุโรคพืช

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราเขม่าดำจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย
2. สารเคมี ได้แก่ Shear's solution, lactophenol, lactic acid, 3-5% KOH, Methylene blue in lactophenol
3. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ stereo พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด SEM (Scanning Electron Microscope) JEOL JSM-5600 LV

วิธีการ

1. สำรวจรวบรวมราเขม่าดำจากแหล่งต่าง ๆ

สำรวจเก็บตัวอย่างโรคราเขม่าดำจากส่วนของรังไข่ เกสรตัวผู้ ช่อดอก ลำต้น ใบ ราก และเมล็ด จากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2548 – เดือนกันยายน 2552 บันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค นำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างแห้งเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

2. การศึกษาราเขม่าดำ

2.1 ศึกษาราเขม่าดำโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช (Direct observation)

ศึกษาลักษณะของราเขม่าดำบนส่วนต่าง ๆ ของพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะต่าง ๆ ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรา ได้แก่ สปอร์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ หยดน้ำหรือสีย้อม และปิดทับด้วย cover slip และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Scanning electron microscope) Vánky (2002)

2.2 การจำแนกราเขม่าดำ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์ และถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Benson, H.J., 1998) และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน นำลักษณะของราดังกล่าวเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดราเขม่าดำ ที่ใช้กันทั่วไปได้แก่ Vánky (2002)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น – สิ้นสุด ตุลาคม 2548 – กันยายน 2552

สถานที่ - แหล่งพืชธรรมชาติ
- แปลงปลูกพืชของเกษตรกร
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจรวบรวมราเขม่าดำจากแหล่งต่าง ๆ

สำรวจ รวบรวมราเขม่าดำจากภาคต่าง ๆ ในประเทศไทยทั้งหมด 33 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกระบี่ กาญจนบุรี กาฬสินธุ์ กรุงเทพ ฯ ขอนแก่น จันทบุรี ชัยภูมิ ชลบุรี เชียงใหม่ เชียงราย ชุมพร นครพนม นครสวรรค์ บุรีรัมย์ ประจวบคีรีขันธ์ พะเยา พังงา พิษณุโลก เพชรบุรี แพร่ ภูเก็ต เลย ศรีสะเกษ สกลนคร สระแก้ว สระบุรี สมุทรสงคราม สุรินทร์ สุราษฎร์ธานี หนองคาย อุดรธานี อุตรดิตถ์ และอุบลราชธานี ได้ราเขม่าดำจำนวนทั้งหมด 145 ตัวอย่าง ตัวอย่างแห้งราเขม่าดำเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

2. การศึกษาราเขม่าดำ

ผลการศึกษาจากตัวอย่างราเขม่าดำบนพืชอาศัยต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และ compound และศึกษาลักษณะผิวของสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด จัดจำแนกราเขม่าดำได้ 13 genera 66 species และ unidentified species 1 ชนิด ส่วนใหญ่ราเขม่าดำที่พบยังไม่มีรายงานในประเทศไทย ส่วนใหญ่ราเขม่าดำที่พบยังไม่มีรายงานใน

ประเทศไทย และจากการสำรวจรวบรวมราเขม่าดำครั้งนี้พบราเขม่าดำชนิดใหม่จำนวนทั้งหมด 12 ชนิด ได้แก่ *Macalpinomyces siamensis* บน *Coelorachis striata* พบที่อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ *Sporisorium clandestinum* บน *Aristida setacea* ที่อำเภอนาคู จังหวัดกาฬสินธุ์ *S. likhitekarajae* บน *Ischemum* sp. ที่อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม *S. pseudosorghi* บน *Pseudosorghum pseudosorghi* ที่เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคอนสาน จังหวัดชัยภูมิ *S. trispicatae* บน *Eulalia trispicata* ที่เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ *Tilletia chiangmaiensis* บน *Arundinella bengalensis* ที่อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ *T. isachneicola* บน *Isachne globosa* ที่อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา *T. filisora* บน *Pennisetum setosum* พบ 3 แหล่ง ได้แก่ เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคอนสาน จังหวัดชัยภูมิ อำเภอนครไทย และอำเภอ วังทอง จังหวัดพิษณุโลก, *T. lageniformis* บน *Hyparrhenia rufa* พบ 2 แหล่ง ได้แก่ เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง และ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ *T. setariae-parviforae* บน *Setaria parviflora* ที่อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร *T. thailandica* บน *Eragrostis amabilis* ที่อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย และ *Yelsemia droserae* บน *Drosera burmanni* เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ที่อำเภอโนนคูณ จังหวัดอุบลราชธานี ตัวอย่างแห้งของราเขม่าดำเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
ราเขม่าดำที่พบมีดังนี้ และได้บรรยายลักษณะของราเขม่าดำชนิดใหม่จำนวนทั้งหมด 12 ชนิด

Cintractia axicola (Berk.) Cornu, Ann. Sci Nat. Bot., Sér. 6, 15: 279, 1883

พบบน *Fimbristylis dichotoma* อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก บ้านวังเย็น จังหวัดเลย อำเภอแม่จัน และ อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเมือง อำเภอเหนือคลอง และอำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร และ อำเภอละหานทราย จังหวัดบุรีรัมย์ อำเภอบ้านตาขุน จังหวัดสุราษฎร์ธานี รา *C. axicola* ที่พบในประเทศไทยนี้เป็นชนิดเดียวกับที่ Lee (1950) และVánky (2002) รายงานไว้ ราชนิดนี้มีพืชอาศัยหลายชนิดในตระกูล Cyperaceae พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นและกึ่งเขตร้อน

Cintractia limitata G.P.Clinton, Proc. Boston Soc. Nat. Hist. 31:399, 1904.

พบบน *Cyperus corymbosus*: ที่อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดขอนแก่น และพบบน *Cyperus mitis*: อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม และอำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และพบบน *Cyperus* ที่จังหวัดเพชรบุรี

รา *Cintractia limitata* ที่พบในประเทศไทยนี้เป็นชนิดเดียวกับที่ Lee (1950) รายงานไว้พบบน *C. compressus* ที่ประเทศจีนและไต้หวัน และมีรายงานพบราชนิดนี้บนพืชตระกูล Cyperaceae หลายชนิด พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะในเขตร้อนชื้นและกึ่งเขตร้อน

Cintractia mitchellii Vánky, Mycotaxon 62:159, 1997

พบบน *Fimbristylis acuminata*: อำเภอวารอนชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี พบบน *F. tetragona*: ที่อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์ และอำเภอพังโคน จังหวัดสกลนคร และพบบน *F. parviflora* ที่อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม (ตารางที่ 1)

รา *Cintractia mitchellii* พบครั้งแรกที่เมือง Perth ประเทศออสเตรเลีย โดย Andrew A. Mitchell พบบน *Fimbristylis schultzii* (Vánky, 1997)

Conidiosporomyces ayresii (Berk.) Vánky, in Vánky & Bauer, Mycotaxon 43: 429 (1992)

พบบน *Panicum maximum* ที่จังหวัดเพชรบุรี เขื่อนปราณบุรี อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ อำเภอทองผาภูมิ และ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย และที่อำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ พบบน *Panicum* ที่อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย พบบน *Megathyrsus maximus* ที่อำเภอทับสะแก และอำเภอบางสะพานน้อย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

Dermatosorus eleocharides Sawada ex L. Ling, Mycologia 41: 268 (1949)

พบบน *Eleocharis dulcis* ที่จังหวัดภูเก็ต

Dermatosorus schoenoplecti Vánky & R.G. Shivas, Fungal Diversity 14: 244 (2003)

พบบน *Schoenoplectus juncoides* อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย และพบราชนิดนี้ทางเหนือของรัฐควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย และประเทศแคมารูน

Entyloma bidentis Henn., in Engler, Die Pflanzenwelt Ost-Afrikas, C: 49 (1895)

พบบน *Biden pilosa* เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคลองสาน จังหวัดชัยภูมิ อำเภอสอง จังหวัดแพร่

Eriocaulago jagdishwarri (J.N. Mishara) Vánky, Mycol. Balcan. 2: 114 (2005)

พบบน *Eriocaulon* ที่อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม

Franzpetrakia microstegii Thirum. & Pavgi, *in* Pavgi & Thirumalachar, *Sydowia*, 1: 2 (1957)

พบบน *Microstegium vagans* ที่อำเภอสังขละบุรี จ. กาญจนบุรี

Macalpinomyces arundinellae-setosae R.G.Shivas & Vánky, *Mycol. Balcan*. 2: 101 (2005)

พบบน *Arundinella setosa* อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ราชนิดนี้พบครั้งแรกและมีรายงานพบเฉพาะทางเหนือของรัฐควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย เท่านั้น (Shivas & Ványky, 2005).

Macalpinomyces bothriochloae (L.Ling) Ványky, *Fungal Diversity* 15: 225 (2004)

พบบน *Bothriochloa bladhii* อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ และพบบน *Bothriochloa pertusa* อำเภอเชียงแสน และอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย

Macalpinomyces bursus (Berk.) Ványky, Mycotaxon 81: 427 (2002)

พบบน *Themeda villosa* ที่อำเภอเวียงเชียงรุ้ง จังหวัดเชียงราย และพบว่า หญ้าชนิดนี้เป็นพืชอาศัยชนิดใหม่ของรา *M. bursus* ที่พบในประเทศไทย

Malcalpinomyces ewartii (McAlpine) Ványky & R.G. Shivas, Mycotaxon 80: 346 (2001)

พบบน *Sorghum nitidum* ที่อำเภอชุน จังหวัดพะเยา

Macalpinomyces siamensis R.G.Shivas, Ványky & P. Athipunyakom sp. nov., *Mycol. Balcan*. 3: 108 (2006) (Fig. 8A)

พบบน *Coelorachis striata* อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก รูปร่างทรงกระบอกยาว ขนาด 1-2 × 10-20 มิลลิเมตร โค้งหรือบิด เยื่อหุ้มหนา ปกคลุมไปด้วยขนแข็ง ผนังหุ้ม sorus (peridium) เริ่มแรกมีสีเขียวต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่อแก่จะแตกออกตามแนวยาว ภายในมีกลุ่มสปอร์สีน้ำตาลเข้มและกลุ่มของ sterile cells รวมตัวกันลักษณะเป็นผงแป้ง

Spores รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม ถึงรูปรีตรงกลางกว้าง ขนาด 6.5-9 × 7-9.5 ไมครอน สีน้ำตาลเข้มอมเขียว ผนังเรียบ หนา 0.5-1 ไมครอน ที่ผิวของสปอร์มีลักษณะเหมือนหนามยื่นออกมา หนาแน่นปานกลาง หนามสูงประมาณ 0.5 ไมครอน กว้าง 0.3-0.4 ไมครอน ผิวสปอร์มีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย

Sterile cells รวมตัวกันเป็นกลุ่ม เกาะกันอย่างหลวม ๆ เซลล์เดียวมีรูปร่างกลม ค่อนข้างกลม หรือรูปรีตรงกลางกว้าง ขนาด 6.5-14.5 × 6.5- 17 ไมครอน สีค่อนข้างใส ผนังเรียบ หนา 0.5 ไมครอน ผนังเรียบ

Microbotryum tenuisporum (Cif.) Ványky, *Mycotaxon* 67: 50 (1998)

พบบน *Polygonum* aff. *barbatum* L.: บริเวณสะพานแม่น้ำแม่กลอง อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี

Moesziomyces bullatus (J.Schröt.) Ványky, *Bot. Not*. 130: 133 (1977)

พบบน *Leersia lexandra* ที่อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอเวียงเชียงรุ้ง จังหวัดเชียงราย และพบบน *Polytrias amaura* โรงแรมกรีนเวิลด์ อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี (ตารางที่ 1) รา *Moesziomyces bullatus* พบมากบนหญ้า *Echinochloa*, *Leersia*, *Paspalum*, *Pennisetum* และ *Uranthoecium*. ราเขม่าดำชนิดนี้พบบนหญ้า *Polytrias* ซึ่งเป็นพืชอาศัยชนิดใหม่ที่พบครั้งแรกในประเทศไทย

Pilocintractia adrianae Vánky, Mycotaxon 95: 54 (2006)

พบบน *Fimbristylis miliacea* ที่จังหวัดแพร่

Pilocintractia fimbristylidicola (Pavgi & Mundk.) Vánky, Mycol. Balcan. 1: 173 (2004)

พบบน *Fimbristylis bisumbellata* ที่จังหวัดประจวบคีรีขันท์

Sporisorium amaurae Vánky & C. Vánky, Mycotaxon 62: 136 (1997)

พบบน *Polytrias amaura* ที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ จังหวัดชุมพร อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย และอำเภอเมือง จังหวัดชุมพร

Sporisorium andropogonis-aciculati (Petch) Vánky, *Mycotaxon* 18: 328 (1983)

พบบน *Chrysopogon aciculatus* อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์

Sporisorium anthistiriae (Cobb) Vánky, *in* Vánky & Guo, *Acta Mycol. Sinica*, Suppl. 1: 230 (1986) [1987]

พบบน *Themeda triandra* อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร พบบน *Themada australis* ที่อำเภอเวียงเชียงรุ้งและอำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย

Sporisorium arthraxonis (Pat.) L.Guo, *Mycosystema* 2: 221 (1989)

พบบน *Arthraxon hispidus* อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ ราชนิดนี้พบครั้งแรกและมีรายงานพบเฉพาะที่ประเทศเวียดนามเท่านั้น

Sporisorium bernstii Vánky, Mycotaxon 85: 37 (2003)

พบบน *Schizachyrium sanguineum* ที่เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

รายงานนี้เป็นรายงานครั้งที่สองที่พบราชนิดนี้บน *S. sanguineum* ซึ่งมี type specimen ที่สุมาตรา (Shivas *etal.,* 2008)

Sporisorium clandestinum R.G.Shivas, Vánky & P.Athipunyakom, *Mycol. Balcan*. 3: 108 (2006)

พบบน *Aristida setacea* Retz.: อำเภอนาคู จังหวัดกาฬสินธุ์ พบบน *A. balansae* ที่อำเภอศรีสงครสม จังหวัดนครพนม

ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดในรังไข่ บางอัน ของช่อดอก เห็นไม่ชัดเจน อยู่ภายในกาบใบล่างมีลักษณะคล้ายหนวดแหลม รูปร่างคล้ายกระสวย เนื้อเยื่อขยายตัว มีขนาด 0.5-1 × 3-4 มิลลิเมตร ผนังหุ้ม sorus เริ่มแรกมีสีเทาหม่น บาง แตกออกเมื่อแก่ ภายในมีกลุ่มของ spore ball สปอร์และ sterile cells เกาะรวมตัวกัน ถึง ลักษณะเป็นเม็ดแป้ง สีดำ

Spore balls รูปร่างและขนาดไม่แน่นอน รูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ รูปรีตรงกลางกว้าง รูปเรียวยาว หรือรูปร่างไม่แน่นอน มีขนาด 30-70 x 40-80(-100) ไมครอน สีน้ำตาลแกมเขียวมะกอก ถึงทึบแสง สปอร์เกาะรวมตัวกัน >10 หรือ >100 สปอร์ ซึ่งแยกออกจากกันได้ง่าย

Spores รูปร่างกลม รูปไข่ รูปรีตรงกลางกว่ง ขนาด 5-6.5 × 5.5-7 ไมครอน สีน้ำตาลอมเขียวมะกอก ผนังสปอร์ไม่ค่อยเรียบ หนา 0.5-0.8 ไมครอน ผิวของสปอร์มีตุ่มเล็ก ๆ ยื่นออกมา ถึงมีลักษณะเป็นคลื่น

Sterile cell อยู่กันเป็นกลุ่มหรืออยู่เดี่ยว ๆ รูปร่างและขนาดไม่แน่นอน รูปร่างกลม รูปไข่ รูปรีตรงกลางกว้าง หรือไม่แน่นอน ขนาด 5-10.5 × 6.5-14(-16) ไมครอน (Fig. 2C) สีเหลืองอมน้ำตาล ผนังเรียบ หรือไม่ค่อยเรียบ หนา 1-2.5(-3) ไมครอน ผิวเรียบหรือบางครั้งพบผิวขรุขระ มีตุ่มสั้น ๆ

Sporisorium cruentum (J.G.Kühn) Vánky, *Symb. Bot. Upsal*. 24: 115 (1985)

พบบน *Sorghum propinquum* อำเภอเชียงแสนและอำเภอขุนตาล จังหวัดเชียงราย และพบบนข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*)

Sporisorium dichanthicola (Mundkur & Thirum.) Vánky, *Fungal Diversity* 15: 229 (2004)

พบบน *Dichanthium caricosum* เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคลองสาน จังหวัดชัยภูมิ อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย และ
อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา ราชนิดนี้พบครั้งแรกและมีรายงานพบเฉพาะในประเทศอินเดียเท่านั้น

Sporisorium doidgeae (Zundel) Langdon & Fullerton, *Mycotaxon* 6: 452 (1978)

พบบน *Bothriochloa bladhii* อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย พบบน *Bothriochloa* ที่อำเภอดอกคำใต้ จังหวัดพะเยา

Sporisorium exsertum (McAlpine) L. Guo, Mycosystema 3: 80 (1990)

พบบน *Themeda triandra* ที่อำเภอเวียงเชียงรุ้ง จังหวัดเชียงราย

Sporisorium flagellatum (Syd., P.Syd. & Butler) Vánky, *Mycotaxon* 62: 139 (1997)

พบบน *Ischaemum indicum* อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย

Sporisorium holstii (Henn.) Vánky, *Mycotaxon* 51: 162 (1994)

พบบน *Themeda triandra* อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร

Sporisorium inopinatum Vánky, *Mycotaxon* 81: 384 (2002)

พบบน *Aristida* sp.: อำเภอนาคู จังหวัดกาฬสินธุ์ จากการสำรวจครั้งนี้พบรา *Sporisorium inopinatum* บนพืชอาศัยดังกล่าวเพียง 1 sorus เท่านั้น

Sporisorium ischaemicola (L.Ling) Vánky, *Mycotaxon* 89: 99 (2004)

พบบน *Ischaemum indicum* อำเภอลำดวน จังหวัดสุรินทร์ บ้านโพธิ์ จังหวัดหนองคาย อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต จังหวัดพิษณุโลก และ อำเภอเวียงเชียงรุ้ง อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย

Sporisorium likhitekarajae R.G. Shivas, Athipunyakom & Mc Taggart, sp. nov.

พบบน *Ischaemum* sp. ที่อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในช่อดอกย่อยทั้งหมดของช่อดอก ราเข้าทำลายส่วนของด้านในสุดของดอกตัวเมีย บางส่วนอยู่ในกลีบดอกชั้นนอกสุด มีผนังหุ้ม sori สีน้ำตาลแกมเหลืองปกคลุม sori อยู่ ต่อมาจะแตกออกในทุกที่ ภายในประกอบด้วยกลุ่มของ spore ball รวมกันอยู่เป็นจำนวนมาก คล้ายก้อนแป้ง ลักษณะคล้ายกระสวย มักพบ columellae

Spore balls ลักษณะของสปอร์รวมตัวกัน ขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน รูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ รูปเรียวยาว หรือรูปร่างไม่แน่นอน ขนาด 30 – 120 x 25-70 ไมครอน สีน้ำตาลแกมแดงเข้มถึงสีค่อนข้างทึบแสง ประกอบด้วยสปอร์รวมกันประมาณ 10 – 100 สปอร์

Spores รูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ รูปทรงรีตรงกลางกว้างถึงรูปร่างไม่แน่นอนและรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาด 8.0-13.5 x 6.5-10.0 ไมครอน สปอร์มี 2 แบบ สปอร์ด้านนอก สีน้ำตาลแกมแดงเข้ม ผนังหนา 0.5-2.0 ไมครอน ผิวผนังเป็นจุดเล็ก ขรุขระ หนาแน่นอย่างปานกลาง ส่วนที่ติดด้านข้างเรียบ ผิวสปอร์เรียบ ส่วนที่ไม่ติดด้านใดมีลักษณะเป็นคลื่นถึงคล้ายฟันละเอียด ด้านในของสปอร์ สีน้ำตาลแกมเหลืองอ่อน ผนังหนา 0.5 ไมครอน ผนังเรียบ

Sterile cell ไม่พบ

Sporisorium manilense (Syd. & P.Syd.) Vánky, *Mycotaxon* 59: 110 (1996)

พบบน *Sacciolepis indica* อำเภอโนนคูน จังหวัดศรีสะเกษ และ อำเภอพังโคน อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร (ตารางที่ 1)

Sporisorium ophiuri (Henn.) Vánky, *Publ. Herb. Ustilag.* Vánky (HUV) 3: 9 (1986)

พบบน *Rottboellia cochinchinensis* อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

Sporisorium paspali-thunbergii (Henn.) Vánky, *Publ. Herb. Ustilag. V□nky* (HUV) 3: 9 (1986)

พบบน *Paspalum orbiculare* อำเภอโนนคูน จังหวัดศรีสะเกษ

Sporisorium pseudosorghi Vánky, R.G. Shivas & Athipunyakom, *Mycol. Balcan*. 3: 108 (2006)

พบบน *Pseudosorghum fasciculare* ที่เขื่อนจุฬาภรณ์ อ. คลองสาน จ. ชัยภูมิ รา เขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori ราเข้าทำลายช่อดอกทั้งหมด sori กว้างประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 7-8 เซ็นติเมตร แฝงตัวอยู่ในส่วนปลายของกาบใบ ภายในมีกลุ่มของสปอร์ ลักษณะเป็นผงสีดำ เกาะรวมกันกับ sterile cell และมี columella ลักษณะยาว โค้งเล็กน้อยหรือมีลักษณะเป็นคลื่น อยู่ตรงกลาง บางครั้งยังพบเศษที่เหลืออยู่ที่แกนของดอก ไม่ค่อยพบ columella แตกกิ่งก้านสั้น ๆ ที่ปลาย

Spores เซลล์เดียว รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม ถึงรูปรีตรงกลางกว้าง มีขนาด 7-9 × 8-10.5 ไมครอน สีน้ำตาลอมเหลืองเข้ม ผนังเรียบ หนาประมาณ 0.5-0.8 ไมครอน ผิวสปอร์ขรุขระ มีตุ่มยื่นออกมาเป็นจุด ๆ อย่างหนาแน่น ผิวสปอร์ภายนอกเรียบ

Sterile cells เกาะกันเป็นกลุ่มมีรูปร่างไม่แน่นอน sterile cells มีเซลล์เดียวลมีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน รูปร่างค่อนข้างกลม รูปรีตรงกลางกว้าง ถึงรูปร่างไม่แน่นอน มีด้านหนึ่งด้านใดหรือหลายด้านที่มีลักษณะแบนราบ มีขนาด 4-12 × 5.5-13 ไมครอน สีค่อนข้างใส ผนังหนาประมาณ 0.5 ไมครอน ผนังเรียบ

Sporisorium sacchari (Rabenh.) Vánky, *Symb. Bot. Upsal*. 24: 120 (1985)

พบบน *Saccharum arundinaceum* etz.: อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอแม่สาย อำเภอเชียงของ อำเภอเวียงเชียงรุ้ง จังหวัดเชียงราย อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก และอำเภอนายูง จังหวัดสกลนคร พบบน *Saccharum spontaneum* ที่อำเภอเมือง จังหวัดเลย พบบน *Saccharum* sp. [c.f. *arundinaceum* Retz.]: เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคลองสาน จังหวัดชัยภูมิ และ อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ และพบบน *Saccharum* sp. ที่อำเภอน้ำโส จังหวัดอุดรธานี

Sporisorium shivasioru Vánky

พบบน *Eulalia trispicata* จังหวัดเชียงใหม่

Sporisorium sorghi C.G. Ehrenberg ex H.F. Link, 1825

พบบนข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ที่จังหวัดนครสวรรค์ (ตารางที่ 1)

Sporisorium tenue (Syd. & P. Syd.) Vánky, Diversity 15: 238 (2004)

พบบน *Bothriochloa bladhii* ที่อำเภอชาติตระการ จังหวัดพิษณุโลก

Sporisorium trispicatae Vánky, R.G. Shivas & Athipunyakom, *Mycol. Balcan*. 3: 108 (2006)

พบบน *Eulalia trispicata* ที่เขื่อนแม่งัด อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่ ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก รูปร่างทรงกระบอกยาว และส่วนปลายเรียวติดอยู่กับส่วนของก้านและปลายยอดเกสรตัวเมีย ขนาด 1 × 10-30 มิลลิเมตร ผนังหุ้ม sori มีสีน้ำตาลอ่อนในระยะแรก และแตกออกตรงส่วนปลายตามแนวยาว ภายในประกอบด้วยกลุ่มของ spore balls มีลักษณะเป็นผงคล้ายแป้ง สีดำ ล้อมรอบ columella รูปร่างยาว columella บางส่วนอาจแตกออก

Spore balls รูปร่างกลม รูปไข่ รูปทรงรีตรงกลางกว้าง ถึงรูปร่างไม่แน่นอน ขนาด 40-90 × 50-140 ไมครอน สีน้ำตาลแดงดำ ประกอบด้วยจำนวนสปอร์ตั้งแต่ 10 หรือหลายร้อยสปอร์รวมกันและสามารถแยกออกจากกันได้ง่าย

Spores มีสองรูปแบบ สปอร์ด้านนอก (outer spore) มีรูปร่างค่อนข้างกลม ellipsoidal ถึงรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาด 9.5-12 × 10.5-14.5 ไมครอน สีน้ำตาลแกมเหลืองเข้ม ผนังสปอร์หนา 0.5-1.5 ไมครอน ส่วนที่หนาที่สุดของผิวสปอร์จะมีผนังขรุขระ (verrucose) สปอร์ด้านใน (inner spore) มีลักษณะกลมหรือรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาดเท่ากับสปอร์ด้านนอก สีน้ำตาลแกมเหลืองอ่อน ผนังหนา 0.5 ไมครอน ผิวสปอร์เรียบหรือเป็นจุดเล็ก ๆ

Sterile cells ไม่พบ

Sporisorium sp. 1

พบบนหญ้า unidentified ที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

Sporisorium sp. 2

พบบนหญ้า unidentified ที่อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

Tilletia chiangmaiensis R.G.Shivas, Vánky & P.Athipunyakom, sp. nov., *Mycol. Balcan*. 3: 112 (2006)

พบบน *Arundinella bengalensis* อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก รูปร่างทรงกระบอกยาว ส่วนใหญ่มักพบรูปราวงโค้งงอหรือบิดเป็นเกลียว ขนาด 1-2 × 10-30 มิลลิเมตร ผนังหุ้ม sori หนา เริ่มแรกมีสีเขียว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และแตกออกตามแนวยาวเมื่อแก่ ภายในมีกลุ่มสปอร์ลักษณะเป็นผงแป้ง สีดำ เกาะรวมตัวกันกับ sterile cells

Spores รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม ถึง รูปทรงรีตรงกลางกว้าง ขนาด 19-26.5 × 19-28 ไมครอน สีน้ำตาลช็อคโกแลต ค่อนข้างทึบแสงหรือทึบแสง ผนังหนา 1.5-2.5(-3) ไมครอน มีตุ่มหรือหนามยื่นออกมาสูงประมาณ 1-1.5(-2) ไมครอน บนผิวของสปอร์มีจุดสีค่อนข้างดำ รูปร่างหลายเหลี่ยมกระจายอยู่ 9-15 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ ในส่วนกลางที่มองเห็นมีจุด 42-62 บนเส้นรอบวง

Sterile cells มีจำนวนมาก รูปร่างและขนาดผันแปร รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม รูปทรงรี ถึงรูปร่างไม่แน่นอน ขนาด 10-28 x 11-36 ไมครอน สีน้ำตาลแกมเหลืองอ่อน ผนังหนา 1.5-5.5 ไมครอน ผิวผนังเรียบ ถึงผนังขรุขระเป็นหนามแบบ verrucose-echinulate ละเอียดถึงหยาบ

Tilletia filisora R.G. Shivas, Vánky & P.Athipunyakom, *Mycol. Balcan*. 3: 113 (2006)

พบบน *Pennisetum setosum* เขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคลองสาน จังหวัดชัยภูมิ อำเภอนครไทย อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก และ อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ และพบบน *Pennisetum* sp. ที่อำเภอแก่งกระจาน จังหวัดเพชรบุรี

ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก สังเกตเห็นได้ยาก รูปร่างทรงกระบอกแคบ ลักษณะใกล้เคียงคล้ายรูปกระสวย ขนาด 0.3-0.7 × 2-6 มิลลิเมตร ส่วนใหญ่มักอยู่ในกลีบดอก มีผนังปกคลุม ลักษณะบาง คงทน สีเทา ของพืชอาศัย ส่วนปลายยอด เมื่อแก่จะแตกออกตามแนวยาว ภายในมีกลุ่มของสปอร์และ sterile cell สีดำ ระยะแรกเกาะกันเป็นก้อน ต่อมาจะมีลักษณะเป็นผงแป้ง

Spores รูปร่าง ขนาด สี และผิวของสปอร์ ผันแปรมาก รูปร่างกลม รูปทรงรี ถึงรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาด 12-20 × 13-24 ไมครอน สีเหลือง – สีน้ำตาลออกช็อคโกแลตเข้ม ถึงค่อนข้างทึบแสง ผนังสปอร์หนา 2-3.5 ไมครอน ผิวสปอร์ขรุขระ มีปุ่มยื่นออกมาสูงประมาณ 1-2.5 ไมครอน ปุ่มมีลักษณะแบนหรือกลม ปุ่มลักษณะราบแบนหรือปลายกลมมน ปุ่มที่ปรากฏเห็นในผิวของสปอร์มีลักษณะกลมถึงรูปหลายเหลี่ยม เป็นจุดสีดำ มีประมาณ 8-16 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ และมีการจัดเรียงตัวของจุดประมาณ 25-45 บนวงตามเส้นศูนย์สูตร

Sterile cells มีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน รูปร่างกลม รูปทรงรีตรงกลางกว้าง ถึงรูปร่างไม่แน่นอน ขนาด 8-22 × 9.5-23(-30) ไมครอน สีค่อนข้างใส ถึง น้ำตาลออกแหลือง ผนังหนา subhyaline to pale 1-2.5 ไมครอน ผิวสปอร์เรียบถึงขรุขระเป็นหนามละเอียดแบบ verrucose-echinulate

Tilletia ischaemi Vánky & N.D.Sharma, *J. Mycopathol. Res*. 39: 71 (2001)

พบบน *Ischaemum rugosum* อำเภอเชียงแสน อำเภอเวียงเชียงรุ้ง อำเภอวังชิ้น จังหวัดเชียงราย ราชนิดนี้พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศอินเดีย

Tilletia isachneicola R.G. Shivas, Athipunyakom & McTaggart

พบบน *Isachne globosa* อ.ตะกั่วป่า จ.พังงา ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก กระจายอยู่ในส่วนของกลีบดอก รูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางยาว 1-1.5 มิลลิเมตร ผนังปกคลุม sori เริ่มแรกมีสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ peridium จะเปิดออกในส่วนยอดภายในประกอบด้วยกลุ่มของสปอร์เกาะรวมกันกับ sterile cells ลักษณะคล้ายผงแป้ง สีดำ

Spores รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม รูปไข่ รูปทรงรีตรงกลางกว้างถึงรูปร่างไม่แน่นอน ขนาด 16 -24 × 17-26 ไมครอน สีน้ำตาลแกมเขียวมะกอกเข้ม ผนังหนา 1.5-3.5 ไมครอน ผิวสปอร์มีปุ่มยื่นออกมาประมาณ 1-2 ไมครอน ลักษณะทู่หรือส่วนปลายแบน สีเข้ม พื้นที่หลายเหลี่ยมหรือค่อนข้างหลายเหลี่ยม มีประมาณ 10-16 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ และในส่วนกลางของสปอร์มีประมาณ 40-50 บนเส้นรอบวงของสปอร์

Sterile cells รูปร่างค่อนข้างกลม รูปทรงรีตรงกลางกว้างหรือรูปค่อนข้างหลายเหลี่ยม มีขนาดไม่แน่นอน ขนาด 7 – 30 × 11 – 35 ไมครอน สีค่อนข้างใสหรือน้ำตาลแกมเหลืองจาง ผนังหนา 1.5 – 5. ไมครอน ผิวผนังเรียบ ลักษณะเป็นจุดเล็กอย่างหนาแน่น ถึงผิวผนังขรุขระ

Tilletia lageniformis Vánky, C.Vánky, R.G.Shivas & P.Athipunyakom, sp. nov., *Mycol. Balcan*. 3: 115 (2006)

พบบน *Hyparrhenia rufa* เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง และอำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก อยู่ใน floral envelopes บางครั้งก็สังเกตุเห็นได้ยาก บางครั้งก็สามารถมองเห็นได้ รูปร่างลักษณะ flask-shaped เมื่อยังอ่อนอยู่ แต่ก็มักพบ

ลักษณะรูปไข่ รูปคล้ายกระสวยกว้าง รูปทรงรี หรือรูปคล้ายทรงกระบอกเมื่อแห้ง ขนาด 0.8-2 × 2-5 มิลลิเมตร เริ่มแรกมี ผนังปกคลุม บาง สีเทา เกิดอยู่บนส่วยปลาย ภายในประกอบด้วยกลุ่มของสปอร์และ sterile cells รวมตัวกัน สีดำ เมื่อส่วนปลายเปิดออกจะเห็นกลุ่มของสปอร์อัดตัวกันแน่นและมีลักษณะเป็นผงแป้งเมื่อแก่

Spores รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม รูปทรงรีตรงกลางกว้าง หรือรูปหลายเหลี่ยม ขนาด 18-25 × 18.5-27 ไมครอน สีน้ำตาลช็อคโกแลต หรือทึบแสง ผนังหนา 2-3 ไมครอน ผนังมีปุ่มลักษณะแบนราบตรงปลายมีลักษณะกลมมน ยื่นออกมา สูงประมาณ 1-2.5 ไมครอน เมื่อสังเกตบริเวณผิวจะเห็นลักษณะเป็นจุดเข้ม ลักษณะกลมถึงรูปหลายเหลี่ยม มีประมาณ 12-17 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของสปอร์ และมีการจัดเรียงตัวของจุดประมาณ 41-54 บนวงตามเส้นศูนย์สูตร

Sterile cells รูปร่างกลม รูปทรงรี ถึงรูปร่างไม่แน่น่อน ขนาด 10.5-30 × 11-35 ไมครอน สีค่อนข้างใส ถึงสีน้ำตาลแกมเหลืองอ่อน ผนังหนา 1-3 ไมครอน ผิวผนังเรียบ หรือขรุขระแบบละเอียดถึงหยาบ

Tilletia setariae-parviflorae Vánky & R.G.Shivas sp. nov., *in* Vánky, *Mycotaxon* 99: 11 (2007)

พบบน *Setaria parviflora* ที่ อำเภอภูพาน จังหวัดสกลนคร ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Tilletia thailandica Vánky & R.G.Shivas sp. nov., *in* Vánky, *Mycotaxon* 99: 19 (2007)

พบบน *Eragrostis amabilis* อำเภอด่านซ้าย จังหวัดเลย ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดอยู่ในรังไข่บางอันของช่อดอก เห็นไม่เด่นชัด รูปไข่ หรือรูปทรงรี ขนาด 0.3-0.5 x 0.4-1 มิลลิเมตร อยู่ใน the floral envelopes เริ่มแรกมี peridium ปกคลุม สีเทาเข้ม ผนังบาง เมื่อ peridium แตกออก ภายในมีประกอบด้วยกลุ่มของสปอร์และ sterile cells รวมตัวกันอยู่ เกาะติดกันเป็นก้อน ถึง ลักาณะผงแป้ง สีดำ หรือ sori สลายตัวไปเป็นชิ้นเล็ก ๆ

Spores รูปร่างกลม ค่อนข้างกลม ถึงรูปทรงรีตรงกลางกว้าง ขนาด 16-21 x 17.5-21.5 ไมครอน สีน้ำตาลแดงถึงสีเหลือง ผนังหนา ผิวผนังมีปุ่มยื่นออกมา สูงประมาณ 2-2.5 ไมครอน ปุ่มมีลักษณะแบน มักไม่ค่อยพบปลายค่อนข้างแหลม เมื่อสังเกตุจากผิวจะเห็นจุดสีดำเข้ม รูปร่างหลายเหลี่ยมหระจายตัวกันอยู่ที่ผิว มีประมาณ 5-7 ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางสปอร์ แยกกันโดยเส้นสีใส ลักษณะแคบ เมื่อสังเกตุจากส่วนกลางจะเห็นปุ่ม ประมาณ 21-29 ปุ่มเรียงตัวกันเป็นวงตามเส้นศูนย์สูตร ไม่พบ hyaline sheath

Sterile cells มีขนาด สี และผิวผนังสปอร์ผันแปร รูปร่างกลม ค่อนข้างกลมถึงรูปทรงรี ขนาด 8-23 x 9.5-25 ไมครอน สีน้ำตาลแกมเหลืองอ่อนถึงค่อนข้างใส ผนังหนา 0.5-1.5 ไมครอน ผิวผนังเรียบ ผนังขรุขระกระจายตัวอยู่ หรือเป็นปุ่มรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ใหญ่ รูปทรงกระบอก

Tilletia vittata (Berk.) Mundk., *Trans. Brit. Mycol. Soc*. 24: 312 (1940)

พบบน *Oplismenus compositus* อำเภอเมือง จังหวัดอุตรดิตถ์ อำเภอเวียงป่าเป้า อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเลย

Trichocintractia utriculicola M. Piepenbring, Can. J. Bot. 73: 1095, 1995

พบบน On *Rhynchospora corymbosa*: อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา อำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ และอำเภอละหานทราย จังหวัดบุรีรัมย์ (พรพิมล และคณะ, 2550)

Piepenbring (1994) ศึกษาราเขม่าดำ *Cintractia utriculicola* บน *Rhynchospora* spp. ราสร้าง sori ใน spikelets ซึ่งแตกต่างจาก *Cintractia* spp. และตั้ง genus ใหม่ของ *Cintractia utriculicola* เป็น *Trichocintractia*

ราชนิดนี้พบมากในเขตร้อนชื้น บนพืชอาศัยตระกูล Cyperaceae ได้แก่ *Rhynchospora corymbosa, R. cyperoides, R gigantean* (Vánky, 2002)

Ustilago coicis Bref., *Unters. Gesammtgeb. Mykol*. 12: 110 (1895)

พบบน *Coix lachryma-jobi* L.: อำเภอวังสระพุง จังหวัดเลย

Ustilago cynodontis (Pass.) Henn., *Bull. Herb. Boissier* 1: 114 (1893)

พบบน *Cynodon dactylon* ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อำเภอเมือง จังหวัดระยอง อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น อำเภอบ้านหมอ จังหวัเสระบุรี อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ หมู่บ้านชลนิเวศน์ และ สระน้ำบริเวณกลุ่มวิจัยกักันพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพ ฯ

Ustilago engenula Syd., P.Syd & E.J.Butler, *Ann. Mycol*. 10: 251 (1912)

พบบน *Eragrostis japonica* อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรีอำเภอตรอน จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดอุดรธานี จังหวัดพิษณุโลก อำเภอแม่สวย จังหวัดเชียงราย และอำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่

Ustilago esculenta Henn., Hedwigia 34: 10 (1895)

พบบน *Zizania latifolia* (หน่อไม้น้ำ) ที่สถานีทดลองข้าว อำเภอดหนือคลอง จังหวัดกระบี่

Ustilago maydis (DC.) Corda, *Icones fungorum* 5: 3 (1842)

พบบน *Zea mays* อำเภอวังสระพุง จังหวัดเลย นครราชสีมา และนครสวรรค์

Ustilago neyraudiae Mundk., *Trans. Brit. Mycol. Soc*. 24: 323 (1940)

พบบน *Neyraudia reynaudiana* อำเภอหางดง และ เขื่อนแม่งัด อำเภอแม่แตง อำเภอพร้าว จังหวัดเชียงใหม่
อำเภอน้ำโส จังหวัดเลย

Ustilago phragmitis L.Ling, *Sydowia* 4: 76 (1950)

พบบน *Phragmites karka* อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ และอำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี

Ustilago planetella R.G. Shivas, Vánky & Athipunyakom in Vánky

พบบน *Eragrostis japonica* อำเภอตรอน จังหวัดอุตรดิตถ์ ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori เกิดในช่อดอกย่อยบางช่อของช่อดอก ราทำลายส่วนในสุดของดอก สังเกตเห็นไม่ชัดเจน รูปร่างกลม รูปไข่หรือรูปทรงรีตรงกลางกว้าง ขนาด 0.2-0.5 × 0.2-0.6 ไมครอน บางครั้งอยาในกาบช่อย่อย peridium สีเทา บาง ปกคลุม ต่อมาแตกออกเมื่อแก่ ภายในประกอบด้วยกลุ่มของสปอร์อัดกันแน่น สีน้ำตาลเข้ม

Spores เมื่อสังเกตุจากด้านข้างมีลักษณะเป็นวงถึงรูปวงรี ขนาด 7-10 ไมครอน มีผนัง 2 ชั้น ผนังบาง ด้าน polar areas ไม่มีสี และกว้าง บริเวณวงเส้นศูนย์สูตรสีเข้มกว่า เมื่อสังเกตุจากด้านหน้าสปอร์มีลักษณะกลม ค่อนข้างกลม หรือรูปทรงรีตรงกลางกว้าง ขนาด 8-10.5 x 9-12 ไมครอน สีน้ำตาลแกมเหลืองอ่อน มีจุดกลมตรงกลางตรงส่วน polar area มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 ไมครอน ผนังสปอร์หนา 1 ไมครอน และสีเข้ม บริเวณวงเส้นศูนย์สูตร และหนา 0.5 ไมครอนที่บริเวณ ผิวสปอร์มีลักษณะเรียบถึงขรุขระแบบ punctate-verruculose ผิวสปอร์ภายนอกเรียบถึงลักษณ์เป็นคลื่นค่อนข้างละเอียดที่บริเวณ

Ustilago scitaminea Syd., *Ann. Mycol*. 22: 281 (1924)

พบบนอ้อย (*Saccharum officinarum*) อำเภอบรรพตพิสัย จังหวัดนครสวรรค์ และอำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี

Ustilago trichophora (Link) Körn., *Hedwigia* 16: 36 (1877)

พบบน *Echinochloa colonum* อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก

Yelsemia droserae R.G.Shivas, Vánky & P.Athipunyakom, *Mycol. Balcan*. 3: 115 (2006)

พบบน *Drosera burmanni* Vahl: อำเภอโนนคูน จังหวัดอุบลราชธานี พืชอาศัยชนิดนี้เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ราเขม่าดำชนิดนี้เป็นราที่พบครั้งแรกและมีรายงานพบในประเทศไทยเท่านั้น

Sori ราสร้าง sori ใน capsiles (เมล็ด) ของ *Drosera* เป็นพืชกินแมลง รา *Yelsemia droserae* ที่พบครั้งนี้เป็นราเขม่าดำชนิดที่สองที่พบในพืชที่กินแมลง เกิดอยู่ในถุงหุ้มทั้งหมดของช่อดอกแต่ละอัน เข้าทำลายเมล็ด ทำให้เมล็ดบวม sori รูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางยาว 1.5-2 มิลลิเมตร สีน้ำตาลดำเข้ม เมื่อแก่ถุงหุ้มจะแตกแยกออกตามแนวยาว ภายในประกอบด้วยกลุ่มของสปอร์มีลักษณะเป็นผลคล้ายแป้ง สีดำ อัดแน่นกันอยู่

Spores รูปร่างกลม ค่อนข้างแบนราบ เมื่อสังเกตด้านข้างของสปอร์มีลักษณะค่อนข้างกลม หรือรูปทรงรีตรงกลางกว้าง กว้าง 25-33 ไมครอน ส่วนของวงตามแนวเส้นศูนย์สูตรมีสีน้ำตาลเข้ม กว้าง 20-28 ไมครอน และด้านตรงข้าม 2 ด้าน polar cap ลักษณะบวม รูปกรวยถึงค่อนข้างกลม สีเหลืองอ่อน บนด้านที่แบน สูง 3-7 ไมครอน กว้าง 12-20 ไมครอน สปอร์ด้านหน้ามีลักษณะกลม รูปรี รูปไข่ถึงรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาด 25-33.5 × 28-38 ไมครอน สีน้ำตาลเข้มถึงค่อนข้างทึบแสงมีวงตรงกึ่งกลาง ผนังสปอร์ของวงตามแนวเส้นศูนย์สูตรหนา 1.5-3 ไมครอน บางกว่า (1-1.5 µm) ส่วนใต้ของ the polar areas ผนังขรุขระ ผิวสปอร์ภายนอกหยาบ

รา *Yelsemia lowrieana* R.G.Shivas & Vánky เป็นอีกชนิดหนึ่งที่พบบน *Byblis rorida* ซึ่งเป็นพืชกินแมลง พบทางตะวันตกของประเทศออสเตรเลีย ราเข้าทำลายลำต้น ดอก และเมล็ด (Shivas & Vánky 2003)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สำรวจ รวบรวมราเขม่าดำ ได้ราเขม่าดำทั้งหมดจำนวน 91 ตัวอย่าง จากจังหวัดต่าง ๆ จำนวน 26 จังหวัด ระหว่างเดือนตุลาคม 2548 ถึง กันยายน 2552 จำแนกชนิดโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา จำแนกชนิดได้ราเขม่าดำได้ 13 genera 52 species ส่วนใหญ่ราเขม่าดำที่พบยังไม่มีรายงานในประเทศไทย และจากการสำรวจรวบรวมราเขม่าดำครั้งนี้พบราเขม่าดำชนิดใหม่ที่จำนวนทั้งหมด 10 ชนิด ตัวอย่างแห้งของราเขม่าดำเก็บไว้ที่พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Dr.Kálman Vánky และ Dr. Roger G. Shivas ในการจำแนกชนิดราเขม่าดำ และได้สอนการจำแนกชนิดของราเขม่าดำ พร้อมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ชุติมันต์ พานิชศักดิ์พัฒนา และเตือนใจ บุญหลง. 2545. โรคของข้าวโพดและการควบคุมโรค. กลุ่มวิจัยโรคพืชไร่ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพ ฯ . 69 หน้า.

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และพจนา ตระกูลสุขรัตน์. 2550. ราเขม่าดำใน Family Cintractiaceae จากประเทศไทย. หน้า 663-670. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน วันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549.

วันทนีย์ อู่วานิชย์. 2545. โรคสำคัญของอ้อย. กลุ่มวิจัยโรคพืชไร่ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพ ฯ . 78 หน้า.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. จัดพิมพ์โดยจามจุรีโปรดักท์ กรุงเทพฯ. 351 หน้า.

Begrew, D., R. Bauer and F. Oberwinkler. 1997 or 1977. Phylogenetic studies on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences of smut fungi and related taxa. Can. J. Bot. 75: 2045-2056.

Benson, H.J. 1998. Fungi: Yeasts and Molds. P. 40-45. *In* Microbiological Applications Laboratory: Complete Version Lab Manual (Manual in General Microbiology) by the McGraw-Hill Companies, USA.

Blanz, P.A. and M. Gottschalk. 1984. A comparison of 5S ribosomal RNA nucleotide sequence from smut fungi. Systematic and Applied Microbiology 5: 518-526.

Lee, L. 1950. Studies in the genus Cintractia. II. C. axicola and related species. Mycologia 42: 646-653.

McKenzie, E.H.C. and K. Vánky. 2001. Smut fungi of New Zealand: An introduction and list of recorded species. New Zealand J. of Bot. 39: 501-515.

Piepenbring, M. 1995. *Trichocintractia*, a new genus for *Cintractia utriculicola* (Ustilaginales). Can.J.Bot. 73: 1089-1096.

Reeder RH, Ellison CA, Thomas MB (1996) Population dynamic aspects of the interaction between the weed *Rottboellia cochinchinensis* (itch grass) and the potential biological control agent *Sporisorium ophiuri* (head smut). Proceedings of the 9th international symposium on biological control of weeds, Stellenbosch, South Africa, 19-26 January 1996, pp.205-211.

Shivas RG, Vánky K, Vánky C, Kula GR, Gavali V (2001) An annotated checklist of Ustilaginomycetes in Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology* 30,231-237.

Shivas RG, Vánky K, (2003). First record of a smut fungus on *Byblidaceae*: *Yelsemia lowrieana*, a new species from Australia. *Fungal Diversity* 13: 131-135.

Shivas R., P. Athipunyakom, S. Likhitekaraj, W. Butranu, T. Bhasabutra, A. Somrith, K. Vánky and C. Vánky. 2007. An annotated checklist of smut fungi (Ustilaginomycetes) from Thailand. Australasian Plant Pathology, 36: 1-7.

Shivas, R., P. Athipunyakom, A.R. Mc Taggart. 2008. New records of smut fungi (*Ustilaginomycetes*) from Thailand, including two new species, *Sporisorium likhitekarajae* and *Tilletia isachneicola*

Thaung MM. 2005 Rusts, smuts and their allies in Burma. *Australasian Mycologist* 24, 29-46.

Titatarn S, Chiengkul A, Unchalisangkas D, Chamkrachang W, Chew-Chin N,

Vánky K. 1997. *Cintractia mitchellii* Vánky. Mycotaxon 62: 159.

Vánky K. 1999. The new classificatory system for smut fungi, and two new genera. Mycotaxon 70: 35-49.

Vánky K. 2002. Illustrated genera of smut fungi, 2nd ed. APS Press, St. Paul. 238 pp.

Vánky K. 2000. New taxa of Ustilaginomycetes. Mycotaxon 74: 343-356.

Vánky K. (2007) Taxonomic studies in *Ustilaginomycetes* – 27. *Mycotaxon* 99, 1-70.

Vánky K, R. Shivas and P. Athipunyakom. 2006. New smut fungi (Ustilaginomycetes) from Thailand. Mycologia. Balcanica. 3: 107-118.

สำรวจรวบรวมและจำแนกราสกุล *Cercosporoid* fungi และ teleomorph

Surveying, Collecting, and Identification of *Cercosporoid* fungi and their teleomorph

พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช
[1]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างราสาเหตุโรคพืชสาเหตุเกิดจาก *Cercosporoid* fungi จำนวน 48 ตัวอย่าง จากพืช 27 ชนิด ในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2550-กันยายน 2552 แล้วนำไปศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อโดยตรง (Direct observation) การแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting) การจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโดยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของราบนเนื้อเยื่อพืช ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่าจำแนกได้รา 5 สกุล (genera) 16 ชนิด (species) ได้แก่ *Asperisporium caricae*, *Cercospora citrullina, C. coffeicola*, *C. lactucae-sativae*, *C. subsessilis*, *C. zinnia*, *Corynespora cassiicola*, *Passalora bougainvillea*, *P. henningsii*, *P. arachidicola*, *P. personata*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Ps. Jujubae*, *Ps. kaki*, *Ps. musae* (teleomorph: *Mycosphaerella musicola*) และ *Ps.stahlii* และราที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (undidentified species) ได้แก่ *Mycosphaerella* 5 ชนิด พบบนใบจุดของบวบ รงทอง ลิ้นจี่ ลิ้นมังกร และเล็บครุฑ *Cercospora* spp. 6 ชนิด บนใบนางแย้ม ส้มโอ กวางตุ้ง ผักปรัง มะระ และทุเรียน และ *Cladosporium* 2 ชนิด พบบนใบจุดแคนตาลูปและขาไก่ และจำแนกชนิดราสาเหตุโรคใบจุดจากตัวอย่างที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *Cercospora* (ใบจุดบานชื่น), *Corynespora cassiicola* (ใบจุดมะละกอและแคนตาลูป), *P. henningsii* (ใบจุดมันสำปะหลัง), *P. arachidicola* (ใบจุดถั่วลิสง), *P. personata* (ใบจุดถั่วลิสง), *citrullina* (ตำลึง), *C. lactucae-sativae* (ใบจุดผักสลัด), *C. subsessilis* (ใบจุดสะเดา), *C. zinnia, Pseudocercospora kaki* (พลับ), *Pseudocercospora jujubae* (พุทรา), *Pseudocercospora musae* (กล้วย)

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-24-51

คำนำ

รา *Cercosporoid* fungi เป็นกลุ่มราที่ใหญ่ที่สุดใน Hyphomycetes ซึ่งราในกลุ่มนี้จะมีรา *Mycosphaerella* Johanson เป็น teleomorphs จัดอยู่ใน Order Dothideales, Family Mycosphaerellaceae (Crous *et al*., 2000) รา *Mycosphaerella* เป็นกลุ่มราที่ใหญ่ที่สุดใน Ascomycetes มีมากกว่า 2,000 ชนิด และมี anamorphic ประมาณ 23 genera กลุ่มที่ใหญ่ที่สุดของ anamorphic genera ของรา *Mycosphaerella* ได้แก่ *Cercospora* มีประมาณ 700 ชนิด, *Pseudocercospora* มีประมาณ 1,300 ชนิด, *Passalora* มีประมาณ 550 ชนิด

ราในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด ส่วนใหญ่ รา *Cercosporoid* fungi มักเป็นสาเหตุของโรคใบจุด ทำให้เกิดแผลทุกส่วนของพืช ได้แก่ ดอก ผล bracts เมล็ด และ pedicle รา *Mycosphaerella musicola, M. fijensis* เป็นสาเหตุโรค Sigatoka ของกล้วย *M. graminicola* เป็นสาเหตุของโรค Septoria leaf blotch ของธัญญพืช *M. fragariae* เป็นสาเหตุโรคใบจุดสตรอเบอรี *M. citri* เป็นสาเหตุโรค greasy spot ของส้ม *M. pini* เป็นสาเหตุโรค needle blight ของสน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กระดาษ ถุงพลาสติค ปากกาเคมี ดินสอ กรรไกรตัดกิ่ง และ GPS

2. อุปกรณ์จัดเก็บตัวอย่างแห้ง ได้แก่ แผ่นไม้อัดทับตัวอย่าง กระดาษ

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ slide cover slip ปากคีบ เข็มเขี่ยปลายแหลม ใบมีดโกน ตะเกียง ยาทาเล็บ

4. สารเคมีสำหรับ mount slide ได้แก่ lactophenol , lactic acid, shear's sulution

5. สารเคมีได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ : สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

6 อาหารวุ้นสังเคราะห์ corn meal agar (CMA), potato dextrose agar (PDA)

7. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ เป็นต้น

8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อเครื่องแก้ว เป็นต้น

9. กล้องจุลทรรศน์ compound microscope และ stereo microscope พร้อมกล้องถ่ายรูปและ camera lucida สำหรับวาดภาพราจากกล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. สำรวจรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากรา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph

สำรวจเก็บตัวอย่างโรคพืชจากส่วนของใบ ดอก ผล กิ่ง ลำต้น และรากของพืช จากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย บันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บรรจุห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาทำศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ และจัดเก็บตัวอย่างแห้งของพืชไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การศึกษารา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph จากส่วนที่เป็นโรค

2.1 การศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง (Direct observation)

ศึกษาลักษณะอาการของราสาเหตุโรคและสังเกตลักษณะของโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์ของราที่เกิดบนใบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะต่าง ๆ ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยส่วนของรา ได้แก่ สปอร์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ หยดน้ำหรือสีย้อม และปิดทับด้วยแผ่น cover slip และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

ถ้าไม่พบสปอร์ของราบนชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคหลังจากตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo และเมื่อเขี่ยเชื้อดูแล้ว ไม่พบราบนชิ้นส่วนพืชให้ทำ moist chamber โดยนำตัวอย่างพืชมาบ่มไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว วางชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรคไว้บนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วและหยดน้ำนึ่งที่ฆ่าเชื้อแล้วบนกระดาษกรองเพื่อให้ความชื้น บ่มไว้อุณหภูมิห้องปฏิบัติการนาน 3-7 วัน ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ยราที่เจริญอยู่บนชิ้นส่วนพืชมาตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound บันทึกลักษณะต่าง ๆ วัดขนาดส่วนต่าง ๆ ของราและถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์

2.2 การศึกษาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค (Tissue transplanting)

ตัดตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบริเวณที่เป็นรอยต่อของส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 2x2 มิลลิเมตร ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวพืช โดยแช่ชิ้นส่วนพืชลงในสารละลายคลอร็อกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจนแห้งสนิท นำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหาร half strength Potato Dextrose Agar (1/2 PDA) และ Malt Extract Agar (MEA) ต้องทำภายใต้ aseptic condition บ่มไว้ในอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ เป็นเวลา 1-3 วัน ตรวจดูเส้นใยราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ตัดปลายเส้นใย (hyphal tip) ของราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืช วางลงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เก็บไว้ที่

อุณหภูมิห้องปฏิบัติการ จนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำไปศึกษารายละเอียดของรา เพื่อการจำแนกชนิดของราต่อไป เก็บรักษาสายพันธุ์ราไว้ในอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

2.3 การจำแนกชนิดรา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph

1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อได้แก่ ลักษณะของเส้นใย ขนาด สี ลักษณะของสปอร์ สี ขนาด ชนิดของโครงสร้างที่ให้กำเนิดสปอร์

2 นำลักษณะสัณฐานที่ได้จากการศึกษาของราดังกล่าวเปรียบเทียบกับคู่มือการจัดจำแนกชนิดรา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph ได้แก่ Chupp (1954); Sivanesan (1984); Crous (1998); Hsieh and Goh (1990); Ellis (1971, 1993); Hanlin (1992, 1998); Guo and Hsieh (1995); Hyde *et al.* (2000); Shin and Kim (2001) และ Crous and Braun (2003)

เวลาและสถานที่

เวลา

เริ่มต้น – สิ้นสุด	ตุลาคม 2550 – กันยายน 2553
สถานที่	- แหล่งพืชธรรมชาติ
	- แปลงปลูกพืชของเกษตรกร
	- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลสำรวจรวบรวมตัวอย่างราสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph

ผลการสำรวจรวบรวมและเก็บตัวอย่างสาเหตุโรคพืชที่เกิดจากรา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph ได้ตัวอย่างโรคพืชทั้งหมด 48 ตัวอย่าง จากพืชทั้งหมด 27 ชนิด ในจังหวัดกาญจนบุรี กรุงเทพฯ ขอนแก่น จันทบุรี ชัยนาท เชียงใหม่ เชียงราย นครปฐม นครนายก นครราชสีมา นครสวรรค์ ตาก ตราด ปทุมธานี ปราจีนบุรี พะเยา พิจิตร เพชรบูรณ์ เพชรบุรี ราชบุรี สงขลา และสระบุรี ตัวอย่างโรคพืชที่รวบรวมได้ทั้งหมดนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการศึกษาราจากเนื้อเยื่อพืชโดยตรง การทำ moist chamber และโดยวิธีการแยกราจากเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค รายละเอียดชนิดพืชที่เก็บตัวอย่างโรค รายละเอียดชนิดพืชที่เก็บตัวอย่างโรค และจำแนกราแสดงอยู่ในตารางที่ 1

2. การศึกษารา *Cercosporoid* fungi และ teleomorph จากส่วนที่เป็นโรค

จำแนกได้รา 5 สกุล (genera) 16 ชนิด (species) ได้แก่ *Asperisporium caricae* (ใบจุดมะละกอ), *Cercospora citrullina* (ตำลึง), *C. coffeicola* (ใบจุดกาแฟ), *C. lactucae-sativae* (ใบจุดผักสลัด), *C. subsessilis* (ใบจุดสะเดา), *C. zinnia* (ใบจุดบานชื่น), *Corynespora cassiicola* (ใบจุดมะละกอและแคนตาลูป), *Passalora bougainvillea* (ใบจุดเฟื่องฟ้า), *P. henningsii* (ใบจุดมันสำปะหลัง), *P. arachidicola* (ใบจุดถั่วลิสง), *P. personata* (ใบจุดถั่วลิสง), *Pseudocercospora dendrobii* (ใบจุดกล้วยไม้), *Ps. Jujubae* (ใบจุดพุทรา), *Ps. Kaki* (ใบจุดพลับ), *Ps. musae* (teleomorph: *Mycosphaerella musicola*) (ใบจุดกล้วย) *Ps. stahlii* (ใบจุดกะทกรก) และราที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ชนิด (undidentified species) ได้แก่ *Mycosphaerella* 5 ชนิด พบบนใบจุดของบวบ รงทอง ลิ้นจี่ ลิ้นมังกร และเล็บครุฑ *Cercospora* spp. 6 ชนิด บนใบนางแย้ม ส้มโอ กวางตุ้ง ผักปรัง มะระ และทุเรียน และ *Cladosporium* 2 ชนิด พบบนใบจุดแคนตาลูปและขาไก่

3. การศึกษาชนิดของเชื้อสเหตุจากตัวอย่างพิพิธภัณฑ์โรคพืช

จำแนกราจากตัวอย่างโรคพืชในพิพิธภัณฑ์โรคพืชทั้งหมด 12 ตัวอย่าง ดังนี้

Cercospora citrullina (ตำลึง), *C. lactucae-sativae* (ใบจุดผักสลัด), *C. subsessilis* (ใบจุดสะเดา), *C. zinnia* (ใบจุดบานชื่น), *Corynespora cassiicola* (ใบจุดมะละกอและแคนตาลูป), *P. henningsii* (ใบจุดมันสำปะหลัง), *P. arachidicola* (ใบจุดถั่วลิสง), *P. personata* (ใบจุดถั่วลิสง), *Pseudocercospora kaki* (พลับ), *Pseudocercospora jujubae* (พุทรา), *Pseudocercospora musae* (กล้วย)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างราสาเหตุโรคพืชสาเหตุเกิดจาก *Cercosporoid* fungi จำนวน 48 ตัวอย่าง จากพืช 27 ชนิด ในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2550-กันยายน 2552 การจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโดยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของราบนเนื้อเยื่อพืช ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ พบว่าจำแนกได้รา 5 สกุล (genera) 16 ชนิด (species) ได้แก่ *Asperisporium caricae*, *Cercospora citrullina, C. coffeicola*, *C. lactucae-sativae*, *C. subsessilis*, *C. zinnia*, *Corynespora cassiicola*, *Passalora bougainvillea*, *P. henningsii*, *P. arachidicola*, *P. personata*, *Pseudocercospora dendrobii*, *Ps. Jujubae*, *Ps. kaki*, *Ps. musae* (teleomorph: *Mycosphaerella musicola*) และ *Ps. stahlii* และราที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ ชนิด (undidentified species) ได้แก่ *Mycosphaerella* 5 ชนิด พบบนใบจุดของบวบ รงทอง ลิ้นจี่ ลิ้นมังกร และเล็บครุฑ *Cercospora* spp. 6 ชนิด บนใบนางแย้ม ส้มโอ กวางตุ้ง ผักปรัง

มะระ และทุเรียน และ *Cladosporium* 2 ชนิด พบบนใบจุดแคนตาลูปและขาไก่ และจำแนกชนิดราสาเหตุโรคใบจุดจากตัวอย่างที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ *Cercospora citrullina* (ตำลึง), *C. lactucae-sativae* (ใบจุดผักสลัด), *C. subsessilis* (ใบจุดสะเดา), *C. zinnia* (ใบจุดบานชื่น), *Corynespora cassiicola* (ใบจุดมะละกอและแคนตาลูป), *P. henningsii* (ใบจุดมันสำปะหลัง), *P. arachidicola* (ใบจุดถั่วลิสง), *P. personata* (ใบจุดถั่วลิสง), *Pseudocercospora kaki* (พลับ), *Pseudocercospora jujubae* (พุทรา), *Pseudocercospora musae* (กล้วย)

เอกสารอ้างอิง

Chupp. C. 1954. A monograph of the fungus genus *Cercospora*. Ithaca, New York.

Crous, P.W. 1998. Mycosphaerella spp. And Their Anamorphs Associated with Leaf Spot Diseases of Eucalyptus. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 170 pp.

Crous, P.W.and U. Braun. 2003. *Mycosphaerella* and its anamorph: 1. Name published in *Cercospora* and *Passalora*. Centraabureau voor Schimmelculture, Utrect, 571pp.

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

Ellis, M.B. 1993. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 507 pp.

Guo, Y.I and W. H Hsieh. 1995. The Genus Pseudocercospora in China. International Academic Publishers, Rebublic of China. 388 pp.

Hanlin, R.T. 1992. Illustrated Genera of Ascomycetes. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 263 pp.

Hanlin, R.T. 1998. Illustrated Genera of Ascomycetes Volume II. APS Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 258 pp.

Hsieh, W.H and T.K. Goh. 1990. *Cercospora* and Similar Fungi from Taiwan. Maw Chang Book, Co., Taipei. 376 pp.

Hyde, K.D., J.E. Taylor and J. Fröhlich. 2000. Genera of Ascomycetes from Palms. Fungal Diversity Press, Hong Kong, 247 pp.

Shin, H.D and J.D. Kim. 2001. *Cercospora* and Allied Genera from Korea. National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea. 302 pp.

Sivanesan, A. 1984. The Bitunicate Ascomycetes and Their Anamorphs. Germany, Braunschweig, J. Cramer, 710 pp.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 รายชื่อรา *Cercosporoid* fungi และteleomorph บนพืชอาศัยต่าง ๆ ระหว่างปี 2550-2552

รา	พืชอาศัย	แหล่งที่เก็บ
Asperisporium caricae	มะละกอ	ขอนแก่น
Cercospora citrullina	ตำลึง	ปทุมธานี สงขลา พิจิตร เชียงใหม่ กาญจนบุรี
Cercospora coffeicola	กาแฟ	เพชรบูรณ์
Cercospora lactucae-sativae	ผักสลัด	เชียงใหม่ เชียงรย
Cercospora subsessilis	สะเดา	ชัยนาท เพชรบูรณ์
Cercospora zinniae	บานชื่น	เพชรบุรี พะเยา กาญจนบุรี
Corynespora cassiicola	มะละกอ	เชียงราย (2 ตัวอย่าง) ปราจีนบุรี สระบุรี
	แคนตาลูป	นครสวรรค์ ตาก
Passalora bougainvillae	เฟื่องฟ้า	เพชรบูรณ์ เชียงราย
Passalora henningsii	มัน สำปะหลัง	ตราด ระยอง
Passalora arachidicola	ถั่วลิสง	เพชรบุรี เพชรบูรณ์
Passalora personata	ถั่วลิสง	เชียงใหม่ พะเยา
Pseudocercospora dendrobii	กล้วยไม้	นครปฐม
Pseudocercospora jujubae	พุทรา	เชียงใหม่ เชียงราย นครราชสีมา สระบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี
Pseudocercospora kaki	พลับ	เพชรบูรณ์ เชียงใหม่
Pseudocercospora musae (teleomorph: *Mycosphaerella musicola*)	กล้วย	เชียงใหม่
Pseodocercospora stahlii	กะทกรก	ปทุมธานี
Mycoshaerella sp. 1	ลิ้นจี่	เชียงราย

ตารางที่ 1(ต่อ)

รา	พืชอาศัย	แหล่งที่เก็บ
Mycoshaerella sp. 2	บวบ	เชียงใหม่
Mycoshaerella sp. 3	เล็บครุฑ	เชียงราย กรุงเทพ ฯ
Mycoshaerella sp.	ลิ้นมังกร	ตาก
Mycoshaerella sp.	รงทอง	จันทบุรี
Cercospora sp. 1	นางแย้ม	นครนายก
Cercospora sp. 2	ส้มโอ	พิจิตร
Cercospora sp. 3	กวางตุ้ง	พิจิตร
Cercospora sp. 4	ผักปรัง	เชียงใหม่
Cercospora sp. 5	มะระ	เชียงใหม่
Cercospora sp. 6	ทุเรียน	นครราชสีมา
Cladosporium sp.	ขาไก่	เพชรบุรี
Cladosporium sp.	แคนตาลูป	พะเยา

สำรวจ รวบรวม และจำแนกรา *Fusarium* สาเหตุโรคพืช

Surveying, Collecting and Identification of Plant Pathogenic *Fusarium*

อภิรัชต์ สมฤทธิ์ ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี ธารทิพย ภาสบุตร สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรคที่คาดว่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชของเกษตรกรตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2552เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร WA สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Fusarium* จำนวน 68 ไอโซเลท และเมื่อจำแนกชนิด (species) ของเชื้อราบริสุทธิ์ทั้งหมด โดยอาศัยลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA, CLA และ KCL และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) สามารถจำแนกได้เชื้อรา *Fusarium* 6 ชนิด (species) ได้แก่ *F. equiseti, F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* และ *F. solani* ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* ทั้งหมดแยกได้จากพืช 24 ชนิดที่ปลูกในพื้นที่ 20 จังหวัด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าเป็นโรคตายพราย กล้วยไม้สกุลแคทรียาเป็นโรคต้นเน่า กล้วยไม้สกุลแดงกิตติเป็นโรคใบไหม้ กล้วยไม้สกุลคาลิบโซ่เป็นโรคใบไหม้ กล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็นโรคโคนใบไหม้ดำ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นโรคเหี่ยว กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าวเป็นโรคใบจุดและใบไหม้ กล้วยไม้สกุลหวายเป็นโรคใบไหม้ ข้าวเป็นโรคถอดฝักดาบและโรคเมล็ดด่าง ต้นกล้าข้าวเป็นโรคใบจุดสีน้ำตาลดำ ข้าวโพดเป็นโรคลำต้นเน่า หรือโรคเส้นใบแดง ข้าวฟ่างเป็นโรคลำต้นเน่าแดง ขิงเป็นโรคเหี่ยว แตงไทยเป็นโรคเหี่ยวและผลเน่า แตงแคนตาลูปเป็นโรคลำต้นและผลเน่า ถั่วลันเตาเป็นโรคเหี่ยว ปอเทืองเป็นโรคเหี่ยว พริกหยวกเป็นโรคเหี่ยว พริกชี้ฟ้าเป็นโรคเหี่ยว มะเขือเทศเป็นโรคต้นเหี่ยว มะเขือเปราะเป็นโรคเหี่ยว ยาสูบเป็นโรคเหี่ยว หอมใหญ่เป็นโรคเหี่ยว และแอสเตอร์เป็นโรคต้นเหี่ยว

รหัสการทดลอง 09-02-49-01-02-01-25-51

คำนำ

Fusarium Fries เป็นราจัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina, form–class Hyphomycetes, form–order Tuberculariales, form-family Tuberculariaceae *Fusarium* เป็นราอาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง เชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคพืชเป็นพวกที่เข้าทำลายและทำให้เกิดโรคทางระบบท่อลำเลียงของพืช ทำให้เกิดโรคเน่าในหัว เหง้า และรากพืช และเป็นสาเหตุโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคสำคัญในต่างประเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* และทำความเสียหายมาก ได้แก่ โรคเหี่ยวในกล้วย (Panama wilt) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พริก ปอ (flax) ฝ้าย ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา หัวหอม มันฝรั่ง กล้วย ส้ม และ แอปเปิล ในประเทศไทยพบราสกุลนี้หลายชนิด กระจัดกระจายอยู่ทั้งในดินและพืช มากกว่าราชนิดอื่นโดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืชเมืองหนาว ฝ้าย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลี แตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และ มันฝรั่ง แต่โรคที่พบว่า เชื้อรา *Fusarium* ทำความเสียหายให้กับพืชในประเทศไทยมากที่สุด คือโรคเหี่ยว (Fusarium wilt disease) กับพืชล้มลุก และพืชผักหลาย ๆ ชนิด และโรคผลเน่า (Fusarium fruit rot) ที่ทำมีการระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตพืชเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะกับพืชตระกูลแตง ที่มีการขยายพื้นที่ปลูกเพื่อจำหน่ายในประเทศ และส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศ ในต่างประเทศมีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อ *Fusarium* ในพืชตระกูลแตงหลายชนิดด้วยกัน เช่น *F. oxysporum* สาเหตุโรค fusarium wilt นอกจากนั้นยังมีเชื้อ *Fusarium* สาเหตุโรคผลเน่า คือ เชื้อรา *F. graminum* Corda, *F. graminearum* Schwabe, *F. acuminatum* Ellis & Everh. sensu Gordon, *F. avenaceum* (Fr.:Fr.) Sacc., *F. culmorum* (W. G. Sm.) Sacc., *F. moniliforme* J. Sheld. แม้ที่ผ่านมาได้มีรายงานการศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* ในประเทศไทยบ้างแล้ว แต่ก็เป็นข้อมูลที่สามารถอธิบายได้เพียงบางส่วนหรือช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยได้มีการปลูกพืชพันธุ์ที่คล้ายคลึงกับพันธุ์ที่ผลิตในต่างประเทศหรือนำเข้าพันธุ์พืชมาจากต่างประเทศมาปลูกเป็นการค้า ซึ่งพืชเหล่านี้มีรายงานการพบโรคเหี่ยวและโรคผลเน่าจากเชื้อราสกุล *Fusarium* อยู่เสมอ ดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการวางแผนการศึกษาเพื่อรวบรวมข้อมูลว่าปัจจุบันประเทศไทย มีเชื้อรา *Fusarium* ชนิด (species) ใหม่เกิดขึ้นเป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวและผลเน่าเกิดขึ้นหรือไม่ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป และความเสียหายของผลผลิตเนื่องจากจุลินทรีย์โรคพืชจึงเกิดเป็นประจำทุกปี ซึ่งผลจากการศึกษาจะทำให้เข้าใจ แหล่งที่มา การผันแปรและการพัฒนาของเชื้อ *Fusarium* ในการทำให้เกิดโรค นอกจากนั้นจากการศึกษายังทำให้ทราบพื้นที่การเกิดโรค แหล่งแพร่กระจาย และได้ culture ของ isolate ต่างๆ ที่จัดจำแนกชื่อชนิดแล้วพร้อมข้อมูลเก็บรักษาไว้ใน culture collection

ของกรมวิชาการเกษตร เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาวิจัยทางด้านต่างๆ เช่น เปรียบเทียบลักษณะที่อาจผันแปรที่เกิดขึ้นของเชื้อในช่วงปีที่ต่างกัน หรือใช้ศึกษาทางด้านอณูชีววิทยา เปรียบเทียบการจัดจำแนกทาง DNA กับการจำแนกทางสัณฐานวิทยาเพื่อยืนยันชื่อที่ถูกต้องของเชื้อบางชนิด (species) หรือศึกษาการสร้างสารพิษ รวมถึงการมีประโยชน์อื่นเป็นต้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรคที่เกิดจาก *Fusarium* จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ WA (Water Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), CLA (Corn Leaf Agar) และ KCL
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับปลูกต้นไม้ในโรงเรือนทดลอง เช่น กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร ดิน พลั่ว บัวรดน้ำ ฯลฯ
6. เมล็ดพันธุ์ หรือต้นกล้าพืช สำหรับทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของ *Fusarium* แต่ละไอโซเลท

วิธีการ

กรรมวิธีและวิธีการทดลอง :

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงอาการเหี่ยว และ ผลเน่า จากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศไทย บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก บันทึกและถ่ายภาพลักษณะอาการของโรค

2. การแยกเชื้อ *Fusarium* จากพืชที่เป็นโรค

2.1 วิธีการวางเนื้อเยื่อพืชเป็นโรคในกล่องชื้น (moist chamber method) โดยนำชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรควางลงบนกระดาษกรองในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อราสร้างสปอร์ จึงแยกสปอร์จากผิวชิ้นส่วนพืช

2.2 วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรคบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (tissue transplanting method) โดยตัดชิ้นส่วนพืชระหว่างส่วนเป็นโรคและส่วนปกติ หรือบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของลำต้นและส่วนโคนของพืชที่แสดงอาการโรคเหี่ยว หรือ บริเวณผลที่มีอาการเน่า ให้มีขนาดประมาณ 5 x 5 มิลลิเมตร ฆ่าเชื้อบริเวณผิวของชิ้นส่วนพืชด้วยคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์

(chlorox 10%) นาน 3-4 นาที แล้วแต่ขนาดของชิ้นส่วนพืช ย้ายลงวางบนอาหาร WA บ่มเชื้อ 24-36 ชั่วโมง ที่ 28 °ซ. เมื่อเส้นใยเจริญออกมา จึงแยกเส้นใยเชื้อลงเลี้ยงบนอาหาร PDA

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

3.1 ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single–spore technique

เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 ลูป (loop; ห่วงลวด) ภายใต้เลนส์ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ลูปที่ปลอดเชื้อแตะสปอร์แขวนลอย แล้วขีด (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหาร PDA

3.2 การจำแนกชนิด : ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

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

3.3 การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลในแปลงปลูก ระดับความเสียหายของโรค บันทึกและถ่ายภาพลักษณะอาการของโรค
2. บันทึกลักษณะโคโลนีที่เจริญของเชื้อบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
3. บันทึกลักษณะสัณฐานและขนาดของเชื้อ ได้แก่ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium
4. บันทึกชนิด (species) ของเชื้อ *Fusarium* ที่พบบนพืชและสถานที่พบโรค

4. การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค

1. เตรียมต้นพืชสำหรับทดสอบ : โดยเตรียมดินร่วน ใส่กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร นำเมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าพืช มาปลูกในกระถางที่บรรจุดินแล้ว วางกระถางปลูกพืชไว้ในโรงเรือน ที่แสงแดดส่องถึง ดูแลรดน้ำและให้ปุ๋ย

2. เตรียม inoculum: เลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* ที่ต้องการทดสอบ บนอาหาร PDA ประมาณ 7 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเมล็ดข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว บ่มเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จากนั้น ชั่งเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่จำนวน 30 กรัม แบ่งเป็น 3 ส่วน ๆ ละ 10 กรัม ฝังไว้ที่โคนต้นพืชที่ต้องการทดสอบ สำหรับเชื้อ *Fusarium* ทีทำให้เกิดอาการโรคทางดอก ผล และใบ ก็นำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อราเจริญอยู่ มาทำสปอร์แขวนลอยในน้ำ ปรับให้มีความหนาแน่นของสปอร์เท่ากับ $1.0x10^5$ สปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร นำสปอร์แขวนลอยพ่น บริเวณส่วนที่พบการเกิดโรค ตรวจสอบการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 1 สัปดาห์

3. ดำเนินการตามวิธีการ Koch's postulate: นำเนื้อเยื่อพืชที่พบโรค มาแยกเชื้อ และจำแนกชนิดตามวิธีการที่ได้ดำเนินการมาในหัวข้อ การศึกษาและการจำแนกชนิด เมื่อได้เชื้อรา Fusarium ชนิดเดียวกับที่ใช้ปลูกเชื้อแล้ว ก็นำมาปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งในพืชชนิดเดิม ตรวจสอบการเกิดโรคและลักษณะอาการที่เกิดขึ้น

4. บันทึก และสรุปผลที่ได้

เวลา เดือน ตุลาคม 2550 – เดือน กันยายน 2553

สถานที่ 1. กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2. แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรคที่คาดว่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชของเกษตรกรตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2552เมื่อนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหาร WA สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Fusarium* จำนวน 68 ไอโซเลท และเมื่อจำแนกชนิด (species) ของเชื้อราบริสุทธิ์ทั้งหมด โดยอาศัยลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA, CLA และ KCL และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) สามารถจำแนกได้เชื้อรา *Fusarium* 6 ชนิด (species) ได้แก่ *F. equiseti, F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* และ *F. solani* ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* ทั้งหมดแยกได้จากพืช 24 ชนิดที่ปลูกในพื้นที่ 20 จังหวัด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าเป็นโรคตายพราย กล้วยไม้สกุลแคทรียาเป็นโรคต้นเน่า กล้วยไม้สกุลแดงกิตติเป็นโรคใบไหม้ กล้วยไม้สกุลคาลิบโซ่เป็นโรคใบไหม้ กล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็นโรคโคนใบไหม้ดำ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นโรคเหี่ยว กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าวเป็นโรคใบจุดและใบไหม้ กล้วยไม้สกุลหวายเป็นโรคใบไหม้ ข้าวเป็นโรคถอดฝักดาบและโรคเมล็ดด่าง ต้นกล้าข้าวเป็นโรคใบจุดสีน้ำตาลดำ ข้าวโพดเป็นโรคลำต้นเน่า

หรือโรคเส้นใบแดง ข้าวฟ่างเป็นโรคลำต้นเน่าแดง ขิงเป็นโรคเหี่ยว แตงไทยเป็นโรคเหี่ยวและผลเน่า แตงแคนตาลูปเป็นโรคลำต้นและผลเน่า ถั่วลันเตาเป็นโรคเหี่ยว ปอเทืองเป็นโรคเหี่ยว พริกหยวกเป็นโรคเหี่ยว พริกชี้ฟ้าเป็นโรคเหี่ยว มะเขือเทศเป็นโรคต้นเหี่ยว มะเขือเปราะเป็นโรคเหี่ยว ยาสูบเป็นโรคเหี่ยว หอมใหญ่เป็นโรคเหี่ยว และแอสเตอร์เป็นโรคต้นเหี่ยว โดยอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* ในพืชแต่ละชนิดมีลักษณะอาการ และสถานที่พบโรคแตกต่างกันไป ดังแสดงใน ตารางที่ 1

สำหรับรายละเอียดของเชื้อรา *Fusairum* จำนวน 6 ชนิดมีดังนี้

1. ***Fusarium equiseti*** **(Corda) Sacc.**

ชื่อพ้อง : *F. equiseti* (Corda) Sacc. pro parte

F. scirpi Lambotte & Fautr. var. *compactum* Wollenw

F. scirpi Lambotte & Fautr. var. *filiferum* (Preuss) Wollenw.

F. roseum Lk, ememd. Snyd. & Hans. 'Equiseti' pro parte

F. roseum Lk. ememd. Snyd. & Hans. 'Gibbosum' pro parte

F. roseum Lk. ememd. Snyd. & Hans. var. *gibbosum* (Wollenw.) Messianen & Cassini pro parte

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยเจริญเร็ว โคโลนีสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีครีม ครีมอมส้มอ่อน จนถึงน้ำตาลอ่อน ใต้โคโลนีมีสีครีมปนน้ำตาล เมื่อโคโลนีมีอายุมากสร้างสปอโรโดเชียม (sporodochium) สีส้ม ไมโค

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA: เชื้อราไม่ค่อยสร้าง microconidium หากสร้างมีรูปไข่ เซลล์เดียว macroconidium รูปร่างคล้ายเคียว ส่วนปลายเรียวยาวและโค้ง เซลล์ที่ฐานมีลักษณะ คล้ายเท้า (foot-shaped) ชัดเจน มี 3-5 ผนังกั้น (septate) ไฟอะไลด์ (phialide) เป็นแบบ monophialide มีทั้งแบบแตกกิ่งก้าน และไม่แตกกิ่งก้าน (branched and unbranched monophialide) เชื้อราชนิดนี้สร้างสปอร์ผนังหนา หรือ chlamydospore จำนวนมาก มีทั้งเกิดเดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ หรือ รวมกันเป็นกลุ่ม มีทั้งแบบผนังเรียบและผนังขรุขระ

เชื้อรานี้พบมากในเขตอบอุ่น และเขตกึ่งร้อน มีพืชอาศัยหลายชนิด เป็นสาเหตุของโรครากและลำต้นเน่าของพวกธัญพืช แต่ไม่รุนแรง พบบนเมล็ดของข้าวฟ่าง ข้าวโพด ข้าวสาลี *Albemochus esculentus, Capsicum annum, Dennisetum glaucum และ Phaseolus aureus* (Neergaard, 1977) ในประเทศไทยมีรายงานว่า เชื้อรานี้เป็นสาเหตุของโรคโคนเน่าแห้งของข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ (พัฒนาและคณะ, 2531) และแยกได้จากแคนตาลูปที่แสดงอาการเหี่ยว จากต้นหน่อไม้ฝรั่งที่แสดงอาการไหม้ และใบจุดของหญ้าคา (ปิยะวดี, 2533) และในดินเกษตรกรรม (พัฒนาและคณะ, 2528)

2. *F. 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 สีส้มบนผิวหน้าอาหาร โคโลนีด้านใต้วุ้นอาหารมีสีม่วง หรือม่วงคราม 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

F. moniliforme สร้าง microconidium ได้ดี และสร้างจำนวนมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่บาง isolate สร้าง macroconidium จำนวนน้อย ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกคือ conidiophore เป็นแบบ monophialide ไม่มีการสร้าง polyphialide และมีการสร้าง microconidium ทั้งแบบเป็นกลุ่ม (false head) และแบบต่อกันเป็นลูกโซ่ ที่มีความยาวมาก บางครั้งมีจำนวนถึง 50 conidium ต่อ 1 ลูกโซ่ (Nelson *et al*., 1983) พัฒนาและคณะ (2543) ได้ศึกษาโรคถอดฝักดาบของข้าวในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ.2537-2538 และอภิรัชต์และคณะ (2545) ได้ศึกษารวบรวมเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว พบว่า ไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากอาการโรคถอดฝักดาบ ในท้องที่ภาคเหนือและภาคกลาง มี microconidiophore ลักษณะเป็น mono- และ polyphialide ซึ่งเป็นลักษณะของ *F. proliferatum* ในประเทศมาเลเซียมีรายงานพบราทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นสาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว (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

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 ขนาดความยาวของโคโลนีในหลอดอาหาร มากกว่า 7 เซนติเมตร เมื่ออายุ 12 วัน sporodochium มีสีส้ม ถึงสีส้มเข้ม โคโลนีด้านใต้อาหารวุ้นมีสีส้มอ่อน สีม่วงแดง จนถึงสีม่วงคราม บาง isolate สร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร 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

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.) และอภิรัชต์และคณะ (2545) ได้ศึกษารวบรวมเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคถอดฝักดาบของข้าว พบว่าเกิดจากเชื้อรา *F. proliferatum* เนื่องจากเชื้อรานี้สร้างก้านชูโคนีเดียแบบ polyphialide

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) ส่วนปลายเรียว

แหลม ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 17-28 x 2.5-4 ไมครอน เกิดบน conidiophore แบบ mono- และ polyphialide ที่แตกกิ่งก้านหรือไม่แตกกิ่งก้าน และซูลอยในอากาศอยู่กับกลุ่มเส้นใย 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

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 เป็นคู่หรือต่อกันเป็นลูกโซ่ ที่บริเวณส่วนปลายหรือส่วนกลางเส้นใย chlamydospore มีขนาด 10-17 x 9-12 ไมครอน

False head ของกลุ่ม microconidium มีขนาดค่อนข้างใหญ่ เมื่อเทียบกับ false head ของ *F. oxysporum* และ *F. moniliforme* ส่วน monophialide ที่สร้าง microconidium มีความยาวเป็น 2 และ 3 เท่าของ 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)

สำหรับการทดสอบในหัวข้อที่ 4. การทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค จะได้ดำเนินการต่อไปในปีงบประมาณ 2553 ซึ่งจะได้นำผลการทดสอบมารายงานต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การรวบรวมและเก็บตัวอย่างพืชเป็นโรคที่คาดว่ามีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium* ในพื้นที่เพาะปลูกพืชของเกษตรกรตามภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2552 สามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Fusarium* จำนวน 68 ไอโซเลท และเมื่อจำแนกชนิด (species) ของเชื้อราบริสุทธิ์ทั้งหมด ตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) สามารถจำแนกได้เชื้อรา *Fusarium* 6 ชนิด (species) ได้แก่ *F. equiseti, F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. semitectum* และ *F. solani* ซึ่งเชื้อรา *Fusarium* ทั้งหมดแยกได้จากพืช 24 ชนิด ที่ปลูกในพื้นที่ 20 จังหวัด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าเป็นโรคตายพราย กล้วยไม้สกุลแคทรียาเป็นโรคต้นเน่า กล้วยไม้สกุลแดงกิตติเป็นโรคใบไหม้ กล้วยไม้สกุลคาลิบโซ่เป็นโรคใบไหม้ กล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็นโรคโคนใบไหม้ดำ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นโรคเหี่ยว กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าวเป็น

โรคใบจุดและใบไหม้ กล้วยไม้สกุลหวายเป็นโรคใบไหม้ ข้าวเป็นโรคถอดฝักดาบและโรคเมล็ดด่าง ต้นกล้าข้าวเป็นโรคใบจุดสีน้ำตาลดำ ข้าวโพดเป็นโรคลำต้นเน่า หรือโรคเส้นใบแดง ข้าวฟ่างเป็นโรคลำต้นเน่าแดง ขิงเป็นโรคเหี่ยว แตงไทยเป็นโรคเหี่ยวและผลเน่า แตงแคนตาลูปเป็นโรคลำต้นและผลเน่า ถั่วลันเตาเป็นโรคเหี่ยว ปอเทืองเป็นโรคเหี่ยว พริกหยวกเป็นโรคเหี่ยว พริกชี้ฟ้าเป็นโรคเหี่ยว มะเขือเทศเป็นโรคต้นเหี่ยว มะเขือเปราะเป็นโรคเหี่ยว ยาสูบเป็นโรคเหี่ยว หอมใหญ่เป็นโรคเหี่ยว และแอสเตอร์เป็นโรคต้นเหี่ยว

สำหรับการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค จะได้ดำเนินการต่อไปในปีงบประมาณ 2553 ซึ่งจะได้นำผลการทดสอบมารายงานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์, พัฒนา สนธิรัตน, นิยม ไข่มุกข์ และธารทิพย ภาสบุตร. 2545. รวบรวมและจำแนกชนิดเชื้อราสกุล *Fusarium* สาเหตุโรคชนิดต่างๆ ของพืชเศรษฐกิจ. รายงานผลงานวิจัยประจำปีกลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ.

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.

ตารางที่ 1 ชนิด (species) ของเชื้อรา *Fusarium* ชนิดพืชที่พบเชื้อ ลักษณะอาการ และ สถานที่พบเชื้อรา *Fusarium* ระหว่างการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และจำแนกชนิดเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคพืช ตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

ชนิด *Fusarium*	ชนิดพืชที่พบเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	ชื่อโรค	ลักษณะอาการ	สถานที่พบ
F. equiseti	แอสเตอร์	1	โรคเหี่ยว	ใบและลำต้นเหี่ยวและแห้ง บริเวณรากมีแผลสีน้ำตาลดำ	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ (1 ไอโซเลท)
F. moniliforme	ข้าวโพด	4	โรคลำต้นเน่า หรือโรคเส้นใบแดง	ใบของต้นเป็นโรคเหี่ยวสลด เส้นใบมีสีแดงลำต้นแห้งตาย หรือแตก เนื้อเยื่อภายในลำต้นมีแผลสีชมพูอมม่วง	อ.พุทธบาท จ.สระบุรี (3 ไอโซเลท) อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี (1 ไอโซเลท)
	ข้าวฟ่าง	4	โรคลำต้นเน่าแดง	ใบและยอดของต้นเป็นโรคบิดงอ ยอดไม่แตกใบเป็นปกติ ต้นแคระแกรน เนื้อเยื่อภายในลำต้นมีแผลสีแดงเข้ม	อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี (3 ไอโซเลท) อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (1 ไอโซเลท)
F. oxysporum	กล้วยน้ำว้า	9	โรคตายพราย (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*)	ใบด้านนอกของลำต้นจำนวน 3-4 ใบ หักพับและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื้อเยื่อท่อลำเลียงภายในลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล	อ.เชียงคาน จ.เลย (1 ไอโซเลท), อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ (1 ไอโซเลท) อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ (1 ไอโซเลท) อ.ท่าฉาง จ.สุราษฎร์ธานี (1 ไอโซเลท) อ.หนองเสือ จ.ปทุมธานี (2 ไอโซเลท) อ.สังคม จ.หนองคาย (2 ไอโซเลท)

1458

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด *Fusarium*	ชนิดพืชที่พบเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	ชื่อโรค	ลักษณะอาการ	สถานที่พบ
F. oxysporum	ขิง	1	โรคเหี่ยว (*F. oxysporum* f. sp. *zingiberi*)	ใบเหลือง ต้นเหี่ยว แคระแกรน เมื่อขุดแง้งขิง พบแผลเน่าสีน้ำตาล ปกคลุมด้วยเส้นใยเชื้อราสีขาว	อ.ภูเรือ จ.เลย
	ถั่วลันเตา	2	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยว ใบเหลือง จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่
	แคนตาลูป	1	ขั้วและผลเน่า	ต้นเหี่ยว ใบสลด ขั้วผลมีแผลไหม้แห้งเป็นสีน้ำตาล รอยแผลลุกลามจากขั้วเข้าสู่เนื้อผล	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
	พริกหยวก	1	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยวฟุบทั้งต้น ใบสลด จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.เชียงแสน จ.เชียงราย
	พริกชี้ฟ้า	6	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยวฟุบทั้งต้น ใบสลด จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน (1 ไอโซเลท) อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ (5 ไอโซเลท)
	ปอเทือง	1	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยวฟุบทั้งต้น ใบสลด จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
	มะเขือเปราะ	1	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยวฟุบทั้งต้น ใบสลด จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน

1459

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด *Fusarium*	ชนิดพืชที่พบเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	ชื่อโรค	ลักษณะอาการ	สถานที่พบ
F. oxysporum	มะเขือเทศ	2	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยวฟุบทั้งต้น ใบสลด จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย (1 ไอโซเลท) อ.เมือง จ.สกลนคร (1 ไอโซเลท)
	ยาสูบ	1	โรคเหี่ยว	ต้นเหี่ยวฟุบทั้งต้น ใบสลด จน เหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อภายในโคนต้นมีแผลสีน้ำตาล	อ.แม่ลาว จ.เชียงราย
	หอมใหญ่	1	โรคเหี่ยว	ใบสลด จนเหลืองแห้งตายไปทั้งต้น เนื้อเยื่อที่โคนต้นมีแผลเน่า มีเส้นใยของสีขาวปกคลุม	อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่
F. proliferatum	กล้วยไม้สกุลคาลิบโซ่	1	โรคใบไหม้	ใบมีจุดแผลไหม้สีดำ และแผลยุบตัว	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
	กล้วยไม้สกุลแคทรียา	1	โรคต้นเน่า	ใบและลำต้นเหี่ยวและแห้ง บริเวณรากมีแผลสีน้ำตาลดำ	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
	กล้วยไม้สกุลแดงกิตติ	1	โรคใบไหม้	ใบมีจุดแผลไหม้สีดำ และแผลยุบตัว	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
F. proliferatum	กล้วยไม้สกุลหวาย	7	โรคใบไหม้	ใบมีจุดแผลไหม้สีดำ และแผลยุบตัว	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี (3 ไอโซเลท) อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (1 ไอโซเลท) อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม (3 ไอโซเลท)

1460

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด *Fusarium*	ชนิดพืชที่พบเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	ชื่อโรค	ลักษณะอาการ	สถานที่พบ
F. proliferatum	ข้าว	13	โรคถอดฝักดาบ หรือโรคหลาว	ต้นข้าวผอมมีสีเขียวอ่อน ลำต้นย่างปล้อง สูงกว่าปกติ โคนต้นและรากมีแผลเน่าสีน้ำตาลดำ เมื่อดึงมักขาดง่าย บางครั้งพบเส้นใยสีชมพูบริเวณโคนหรือข้อที่ย่างปล้องขึ้นมา	อ.แม่สรวย จ.เชียงราย (2 ไอโซเลท) อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ (2 ไอโซเลท) อ.เมือง จ.แพร่ (1 ไอโซเลท) อ.บุณฑริก จ.อุบลราชธานี (2 ไอโซเลท) อ.เดชอุดม จ.อุบลราชธานี (2 ไอโซเลท) อ.เมือง จ.สุรินทร์ (3 ไอโซเลท) อ.กระสัง จ.สุรินทร์ (1 ไอโซเลท)
F. semitectum	ข้าว	1	โรคเมล็ดด่าง	เมล็ดข้าวและรวงข้าวมีแผลเป็นจุดสีเทาปนชมพู เมล็ดข้าวลีบแห้ง	อ.ปางมะผ้า จ.แม่ฮ่องสอน
F. semitectum	ข้าว	1	โรคใบจุด	ต้นกล้าข้าวสูงประมาณ 15 เซนติเมตร มีใบเป็นแผลจุดสีน้ำตาลขนาดประมาณ 1-3 มิลลิเมตร กระจายทั่วใบ	อ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี
	แตงไทย	1	โรคเหี่ยวและผลเน่า	ต้นและใบเหี่ยวฟุบ บริเวณโคนและรากมีแผลสีน้ำตาล ถึงน้ำตาลแดง ผลมีแผลเน่ายุบตัว และมีเส้นใยสีขาวปกคลุม	อ.คลองสามวา จ.กรุงเทพมหานคร

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด *Fusarium*	ชนิดพืชที่พบเชื้อ	จำนวนไอโซเลท	ชื่อโรค	ลักษณะอาการ	สถานที่พบ
F. semitectum	แตงแคนตาลูป	1	โรคผลเน่า	ผลมีแผลเน่ายุบตัว และมีเส้นใยสีขาวปกคลุม	จ.สระแก้ว
F. solani	กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี	1	โรคเหี่ยว	ใบและลำต้นเหี่ยวและแห้ง บริเวณรากมีแผลสีน้ำตาลดำ	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
	กล้วยไม้สกุลแวนด้า	1	โรคโคนใบไหม้ดำ	โคนใบมีจุดแผลไหม้สีดำ ต้นเหี่ยว	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
	กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว	1	โรคใบจุดและใบไหม้	ใบจุดแผลสีน้ำตาลดำ กระจัดกระจายทั่วใบ	อ.เมือง จ.ปราจีนบุรี
	แตงแคนตาลูป	3	โรคลำต้นเน่าและผลเน่า	ต้นและใบเหี่ยวฟุบ บริเวณโคนและรากมีแผลสีน้ำตาล ถึงน้ำตาลแดง ผลและขั้วผลมีแผลเน่ายุบตัว และมีเส้นใยสีขาวปกคลุม	อ.พยุหะคีรี จ.นครสวรรค์ (1 ไอโซเลท) จ.สระแก้ว (2 ไอโซเลท)
	รวม	**68 ไอโซเลท 6 ชนิด** (species)			

1462

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เตรียมขึ้นตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983)

มันฝรั่ง (Potato)	250	กรัม
น้ำตาล Dextrose	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3. Water Agar 1.5% (WA)

วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

4. Corn Leaf Agar (CLA)

วุ้นผง (Agar)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ใบข้าวโพดขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว

เตรียมโดยวางใบข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อแล้ว ที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ WA 1.5% แล้วเก็บจานอาหารไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-4 วัน เมื่อไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา จึงใช้เลี้ยงเชื้อราได้

สำรวจ รวบรวม และจำแนกเชื้อราสกุล *Curvularia* spp.

Survey Collect and Identification of *Curvularia* spp.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส[1] ทัศนาพร ทัศคร[1] ธารทิพย ภาสบุตร[1]

[1] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และจุดจากแหล่งปลูกในประเทศไทย ตรวจลักษณะอาการของโรคในแปลงปลูก นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาจำแนกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ถ่ายรูปตัวอย่างโรคแล้วจัดทำ permanent slide เพื่อการวินิจฉัยโรค สามารถจำแนกเป็นเชื้อราสกุล *Curvularia* ทั้งสิ้น 41 ไอโซเลท ดังนี้ โรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia lunata* ได้แก่ โรคใบจุดข้าวโพดมี โรคเมล็ดด่างข้าว โรคใบจุด โรคใบไหม้เยอบีร่า โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง โรคใบไหม้สบู่ดำ มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia eragrostidis* **ได้แก่**โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน โรคดอกสนิม หรือโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia tuberculata* ได้แก่ โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออยซิเดียม มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia prasadii* ได้แก่ โรคใบจุดแกลดดิโอลัส มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia pallescens* ได้แก่ โรคใบไหม้ลิ้นมังกร มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia* sp. ได้แก่ ใบจุดบานชื่น และ ฝักจุดกระเจี๊ยบแดง

รหัสการทดลอง 09 02 49 01

คำนำ

เชื้อราสกุล *Curvularia* จัดอยู่ใน From-class Hyphomycetes Form –order Hyphomycetales From-family Dematiaceae โดยเชื้อราจะสร้าง conidium ที่มี 3-5 เซลล์ รูปร่างโค้ง เซลตรงกลางมีสีเข้มกว่าเซลล์หัวท้าย เกิดบนก้าน conidiophore สีเข้มไม่แตกกิ่งก้าน แต่อาจมีการ proliferation ออกทางด้านข้างใกล้ส่วนปลาย ทำให้สร้างสปอร์เพิ่มขึ้นได้อีก และก้าน conidiophore มีลักษณะเป็นข้อหัก (geniculate) (วิจัย, 2551) เชื้อราสกุล *Curvularia* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชไร่และพืชสวนหลายชนิด มีรายงานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อรา *Curvularia lunata* บนข้าวโพดโดยใบข้าวโพดจะมีอาการจุดเล็กๆขนาดเท่าหัวเข็มหมุดสีเขียวอ่อนต่อมาตรงกลางจุดจะแห้งมีสีเทาหรือน้ำตาลอ่อน (ขจรศักดิ์,2509) แตงฝรั่ง แตงเทศ(ปราณีตและคณะ, 2532) แกลดิโอลัส(ประสาทพร, 2521) พบจุดสีน้ำตาลเข้มบนใบ กรรณิการ์และคณะรายงานว่าพบโรคผลเน่าบนลิ้นจี่โดยลิ้นจี่ที่พบมีจุดสีน้ำตาลเข้มบนผลลิ้นจี่ทำให้ผลผลิตลิ้นจี่เน่าเสียเร็ว และเชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสาเหตุของโรคผลเน่าดำบนมะละกอ นอกจากนี้เชื้อรา *Curvularia lunata* เป็นสาเหตุโรคเมล็ดเน่าดำบนข้าวฟ่าง(Chandrasrikul, 1962) เชื้อรา *Curvularia eragrostidis* สาเหตุโรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนกล้วยไม้(ศิริลักษณ์และคณะ, 2521) โดยทำให้ดอกกล้วยไม้เป็นจุดสีเหลืองอมน้ำตาลต่อมาจุดขยายใหญ่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีเข้มคล้ายสีสนิม และเป็นสาเหตุโรคใบไหม้บนปาล์มน้ำมัน(ปรานีและคณะ, 2522) เชื้อรา *Curvularia* spp. สาเหตุของโรคฝักจุดหรือฝักลาย(Pot spot) บนกระเจี๊ยบเขียว(นิยมรัฐและลักษณา, 2533) โรคใบจุดบนต้นกล้าของมะพร้าว(ศรีสุรางค์ และคณะ, 2526) โรคใบจุดบนยางพารา(พงษ์เทพ, 2531) การเกิดโรคของพืชที่มีรายงานไว้แต่เดิมอาจเกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือจากการเขตกรรม เนื่องจากเกษตรกรมีการดูแลรักษาที่ดีขึ้นกว่าเดิม หรืออาจเป็นเพราะความต้านทานของพืชเอง ที่ทำให้เชื้อลดความรุนแรงลงหรือหมดไป ในทางตรงข้ามความรุนแรงของโรคอาจมีมากขึ้น หรือมีการแพร่ระบาดของโรคเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งในปัจจุบันการปลูกพืชมีการเปลี่ยนแปลงสถานที่และชนิดพืช มีการนำพืชจากต่างประเทศเข้ามาปลูก ดังนั้นการสำรวจรวบรวมเชื้อรา *Curvularia* spp. จึงมีความจำเป็นเพื่อให้ทราบถึงการแพร่ระบาดของเชื้อรา *Curvularia* spp. ในประเทศไทยสำหรับเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อการนำไปศึกษาด้านอื่นต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปากกาเคมี หนังยาง กรอบไม้อัดตัวอย่างแห้งโรคพืช

2. สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)

4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระบอกตวงใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม สไลด์ cover slip

5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง

6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. **สำรวจ รวบรวมตัวอย่างโรคของพืชผัก ไม้ผล พืชไร่ และวัชพืช ที่มีลักษณะอาการไหม้หรือจุดจากแหล่งปลูกทั่วประเทศ**

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคของพืชผักไม้ผล พืชไร่ และวัชพืช จากแหล่งปลูกที่สำคัญทั่วประเทศ ได้แก่ แหล่งปลูกในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตกและภาคใต้ ระหว่างเดือน ตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2552 ตรวจลักษณะอาการของโรคในแปลงปลูก ถ่ายภาพตัวอย่างโรค บันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ และลักษณะอาการของโรค ห่อตัวอย่างพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ ใส่ในถุงพลาสติก บรรจุห่อตัวอย่างลงในกล่องเก็บความเย็น เพื่อนำมาศึกษาชนิดและแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการโรคพืช กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ

2. **การศึกษาลักษณะอาการของโรคบนพืชต่าง ๆ**

2.1 การศึกษาราโดยตรงจากเนื้อเยื่อพืช (Direct observation)

ศึกษาลักษณะอาการของโรคบนพืชไม้ผล พืชผัก พืชไร่ และวัชพืช ในสภาพธรรมชาติ และสังเกตลักษณะของ ราที่เกิดบนพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo บันทึกลักษณะต่าง ๆ ใช้เข็มปลายแหลมเขี่ย สปอร์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของรา มาวางบนสไลด์ หรือใช้ใบมีดตัดขวางชิ้นส่วนพืชให้บาง ๆ หยดน้ำ และปิดทับด้วย cover slip และตรวจดูลักษณะต่าง ๆ ของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound

2.2 การแยกเชื้อราโดยวิธี Tissue transplant

นำตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้หรือจุดมาแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplant โดยตัดชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคขนาด 3x5 มม. ฆ่าเชื้อภายนอกด้วยโซเดียมไฮเปอร์

คลอไรด์ 10% เป็นเวลา 2-4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออีก 2 ครั้ง วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในสภาพปลอดเชื้อ บ่มเชื้อไว้นาน 2-3 วัน ทำ hyphal tip isolation นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อจำแนกเชื้อต่อไป

3. **การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของเชื้อรา** *Curvularia*

ศึกษาลักษณะและสีของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของเชื้อ ***Curvularia*** สาเหตุโรคพืช โดยจัดทำ permanent slide เพื่อการวินิจฉัยสาเหตุโรค แล้วถ่ายภาพเชื้อราสาเหตุโรคใต้กล้องจุลทรรศน์

4. **การจำแนกชนิด เชื้อรา** *Curvularia*

นำลักษณะของราดังกล่าวเปรียบเทียบผลการศึกษา ลักษณะของก้านสปอร์ และ สปอร์ กับคู่มือการจำแนกเชื้อรา class Hyphomycetes ของ Ellis M.B. (1971)

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2550 – กันยายน 2552

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจรวบรวมตัวอย่างโรคพืชจากแหล่งปลูกต่าง ๆ

ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการไหม้หรือจุดของพืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล พืชไร่ และวัชพืช ได้รวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการไหม้หรือจุดจากแหล่งปลูกพืชในภาคเหนือ 17 ตัวอย่าง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ -3 ตัวอย่าง ภาคกลาง 15 ตัวอย่าง ภาคตะวันตก จำนวน 2 ตัวอย่าง ภาคตะวันออก จำนวน 3 ตัวอย่าง ภาคใต้ จำนวน 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 41 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกจังหวัดต่างๆ ได้แก่ เชียงใหม่ ตาก พิษณุโลก อุตรดิตถ์ สระบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี กรุงเทพมหานคร นครปฐม สระแก้ว กระบี่ ปราจีนบุรี เชียงราย ปทุมธานี ลำปางชัยนาท และนครราชสีมา โดยแบ่งเป็นไม้ดอกไม้ประดับ จำนวน 18 ตัวอย่าง และพืชไร่ จำนวน 23 ตัวอย่าง

(ตารางที่ 1)

2. การจำแนกชนิดเชื้อสาเหตุ

ผลการศึกษาลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืชแต่ละชนิดและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุในห้องปฏิบัติการจากตัวอย่างพืชต่างๆ ที่แสดงอาการโรค โดยเปรียบเทียบกับเอกสารการจัดจำแนกเชื้อรา class Hyphomycetes ของ Ellis M.B. (1971) สามารถจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา *Curvularia* ได้ 41 ไอโซเลท เป็น 6 ชนิด คือ

1. เชื้อ *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำอมเขียว สปอร์สีน้ำตาลอ่อน รูปร่างตรงหรือโค้ง ปลายเรียว มี 3 septate โดยเซลล์ที่สามมีขนาดใหญ่สุดและมีสีเข้มกว่าหัวท้าย มีฐานสปอร์ชัดเจน

1.1 โรคใบจุดข้าวโพด

ลักษณะอาการ

อาการของโรคส่วนใหญ่จะแสดงให้เห็นบนใบ แต่บางครั้งอาจพบบนกาบใบ และฝัก ด้วย ระยะแรกเกิดเป็นจุดเล็กๆ สีเขียวอ่อน ต่อมาตรงกลางจุดจะแห้งมีสีเทาหรือสีน้ำตาลอ่อน ล้อมรอบด้วยวงแหวนสีน้ำตาลแดงในที่สุดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำไหม้และมีวงแหวนสีเหลืองล้อมรอบอีกชั้นหนึ่ง จุดใหญ่เต็มที่จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง

1.2 โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง

ลักษณะอาการ

เมื่อเมล็ดข้าวฟ่างเริ่มแก่ และในอากาศมีความชื้นสูง เชื้อราจะสร้างสปอร์ขึ้นปกคลุมเมล็ดข้าวฟ่าง ทำให้เห็นเมล็ดข้าวฟ่างมีผงสีเทาหรือดำขึ้นปกคลุม ซึ่งเชื้อราชนิดนี้มีผลต่อคุณภาพของเมล็ดข้าวฟ่าง เนื่องจากประเทศไทยมีอากาศร้อนชื้นเชื้อราหลายชนิดเป็นสาเหตุของโรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง ซึ่งเชื้อราจะเข้าทำลายในฤดูฝนเมื่อเมล็ดใกล้แก่เชื้อราจะสร้างสปอร์ปกคลุมเมล็ดทำให้เกิดเป็นสีดำ สีชมพู สีส้ม ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อราที่เข้าทำลาย สำหรับโรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่างที่มีสาเหตุจาก เชื้อรา*Curvularia lunata* จะมีผงสีเทาหรือดำขึ้นปกคลุม (นิรนาม, 2549)

1.3 โรคใบไหม้สบู่ดำ

ลักษณะอาการ

จุดสีน้ำตาลเข้มบนใบสบู่ดำ ต่อมาจุดจะขยายเป็นแผลสีน้ำตาลเข้มขนาดแผลไม่แน่นอนบนใบสบู่ดำ ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงแผลจะขยายรวมกันทำให้ใบไหม้แห้ง

1.4 โรคใบจุดหน้าวัว

ลักษณะอาการ

แผลกลมสีน้ำตาลเข้มขอบแผลสีเหลือง กลางแผลมีสีเทา ขนาดแผล 3-5 มิลลิเมตร บนใบหน้าวัว เมื่อมีความชื้นสูงแผลจะขยายใหญ่ขึ้น

1.5 โรคใบไหม้เยอบีร่า

ลักษณะอาการ

ใบของเยอบีร่ามีแผลค่อนข้างกลมสีน้ำตาลขอบสีน้ำตาลเข้ม เมื่อมีความชื้นสูงแผลจะมีขนาดใหญ่ขึ้น ในพันธุ์ที่อ่อนแอและสภาพแวดล้อมเหมาะสมพบหลายแผลในหนึ่งใบและแผลสามารถขยายรวมกันทำให้ใบไหม้แห้งได้

2. เชื้อ *Curvularia prasadii* R. L. & B. L. Mathur

สปอร์ตรงหรือโค้งเล็กน้อย คล้ายกระบอง มี3-4 septate สปอร์บางอันมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลเข้มทุกเซลล์ บางสปอร์เซลล์แรกมีสีอ่อน หรือบางสปอร์เซลล์แรกและเซลล์ท้ายมีสีอ่อนกว่าเซลล์ตรงกลาง

2.1 โรคใบจุดแกลดดิโอลัส

ลักษณะอาการ

จุดสีน้ำตาลแดงบนใบแกลดดิโอลัส ขนาดของแผลไม่เท่ากัน ต่อมาจุดขยายใหญ่ขึ้นทำให้เกิดแผลไหม้แห้งสีน้ำตาล

3. เชื้อ *Curvularia pallescens* Boedijn

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเทา สปอร์ตรงหรือโค้งเล็กน้อย สปอร์สีน้ำตาลอ่อน มี 3 septate ผนังกั้นเซลล์ที่อยู่ตรงกลาง มักจะไม่อยู่กึ่งกลาง

3.1 โรคใบไหม้ลิ้นมังกร

ลักษณะอาการ

พบแผลรูปไข่ขนาดเล็กบนใบของลิ้นมังกร ภายในแผลมีสีซีดคล้ายฟางข้าว ขอบแผลสีน้ำตาลเข้ม

4. เชื้อ *Curvularia eragrostidis* (P. Henn) J.A. Meyer

สปอร์รูปไข่ ผิวเรียบ สีน้ำตาลเข้ม ไม่มีติ่งยื่นออกมา มี3 septate สปอร์มีรูปร่างเป็นแบบสมมาตร ก้านชูสปอร์สีน้ำตาล ตรงหรือโค้ง ส่วนปลายมักบิดงอ

4.1 โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนกล้วยไม้สกุลหวาย

ลักษณะอาการ

ดอกกล้วยไม้เป็นจุดสีเหลืองอมน้ำตาลต่อมาจุดขยายใหญ่ขึ้นเปลี่ยนเป็นสีเข้มคล้ายสีสนิม พบระบาดรุนแรงในกล้วยไม้สกุลหวาย ทัศนาพรและ สุรภี(2548)รายงานว่าเชื้อรา *C. eragrostidis* เป็นสาเหตุโรคดอกสนิมหรือจุดสนิม เป็นโรคที่จักกันดีในหมู่ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อตัดดอกขายต่างประเทศ บางครั้งอาจแสดงอาการระหว่างการขนส่ง เป็นมากกับกล้วยไม้สกุลหวาย

โดยเฉพาะหวายมาดาม หวายขาว หวายชมพูและหวายซีซาร์ ลักษณะอาการ ปรากฏบนกลีบดอกกล้วยไม้ โดยเริ่มแรกเป็นจุดขนาดเล็กสีน้ำตาลเหลือง เมื่อจุดเหล่านี้ขยายโตขึ้นจะเข้มเป็นสีสนิม มีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.1–0.3 มิลลิเมตร ลักษณะดังกล่าวจะปรากฏชัดเจนบนดอกหวายมาดาม แต่อาการบนหวายขาวจะเป็นแผลสีน้ำตาลไม่เป็นแผลสีสนิมชัดเจนอย่างบนหวายมาดาม โรคนี้ระบาดได้ดีในช่วงฤดูฝนโดยเฉพาะถ้ามีฝนตกติดต่อกันเป็นเวลานานๆ หรือมีน้ำค้างลงจัด โดยจะระบาดติดต่อกันรวดเร็วทั่วทั้งรังกล้วยไม้และบริเวณใกล้เคียง

4.2 โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน

ลักษณะอาการ

โรคนี้พบระบาดรุนแรงในระยะต้นกล้า ลักษณะอาการเริ่มต้นพบแผลบนใบของปาล์มน้ำมันมีลักษณะปุ่มตรงกลางมีสีน้ำตาล รอบแผลมีวงสีเหลืองล้อมรอบ แผลรูปร่างกลมรี เมื่อเกิดระบาดรุนแรง แผลขยายตัวรวมกันทำให้ใบไหม้แห้งม้วนงอ และเปราะฉีกขาดง่าย การเจริญเติบโตของต้นกล้าชะงักไม่เหมาะในการนำไปปลูก ในกรณีที่โรครุนแรงทำให้ต้นกล้าถึงตายได้

5. เชื้อ *Curvularia tuberculata* Jain

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีดำ หรือ น้ำตาลอมเทา สปอร์มีรูปร่างตรง รูปไข่ หรือคล้ายกระบอง ผนังสปอร์หยาบ สปอร์ มี3-5 septate

5.1 โรคดอกจุดบนกล้วยไม้สกุลออยซิเดียม

ลักษณะอาการ

ดอกกล้วยไม้มีอาการจุดกลมขนาดเล็กสีน้ำตาลเข้มหรือดำบนกลีบดอก เมื่อมีความชื้นสูงจุดกลมจะขยายใหญ่ขึ้นทำให้เกิดแผลไหม้บนกลีบดอก

6. เชื้อ *Curvularia* sp.

โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมี น้ำตาลอมดำ สปอร์มีรูปร่างโค้งสองข้างไม่เท่ากัน เซลล์ที่สามมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ

6.1 โรคจุดฝักกระเจี๊ยบแดง

ลักษณะอาการ

อาการเริ่มแรกพบแผลกลมปุ่มสีดำบนฝักกระเจี๊ยบต่อมาแผลเปลี่ยนเป็นสีเทาขอบแผลสีดำ นอกจากนี้สามารถพบแผลได้ทั้งกลีบเลี้ยง และก้านฝัก

6.2 ใบจุดบานชื่น

ลักษณะอาการ

แผลค่อนข้างกลมสีเทาขอบแผลสีน้ำตาลบนใบบานชื่น ในฤดูที่มีความชื้นสูง สามรถพบแผลได้หลายแผลในหนึ่งใบเมื่อแผลขยายรวมกันทำให้ใบไหม้แห้งได้

สรุปผลการทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชที่มีลักษณะอาการไหม้และจุดจากแหล่งปลูกในประเทศไทยศึกษาลักษณะอาการของโรคบนพืชต่างๆในแปลงปลูก นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคมาจำแนกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplant ในห้องปฏิบัติการ ถ่ายรูปตัวอย่างโรคแล้วจัดทำ permanent slide เพื่อการวินิจฉัยโรค สามารถจำแนกเป็นเชื้อราสกุล *Curvularia* ทั้งสิ้น 41 ไอโซเลท 6 สกุล โรคพืชที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia lunata* ได้แก่ โรคใบจุดข้าวโพดมี จำนวน 17 isolate โรคเมล็ดด่างข้าว จำนวน 2 isolate โรคใบจุดหน้าวัว จำนวน 2 isolate โรคใบไหม้เยอบีร่า จำนวน 3 isolate โรคเมล็ดเน่าดำข้าวฟ่าง จำนวน 1 isolate โรคใบไหม้สบู่ดำ จำนวน 2 isolate มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia eragrostidis* ได้แก่โรคใบไหม้ปาล์มน้ำมัน จำนวน 1 isolate โรคดอกสนิมหรือโรคจุดสนิมบนดอกกล้วยไม้สกุลหวาย จำนวน 5 isolate มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia tuberculata* ได้แก่ โรคจุดบนกล้วยไม้สกุลออยซิเดียม มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia prasadii* ได้แก่ โรคใบจุดแกลดดิโอลัส จำนวน 2 isolate มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia pallescens* ได้แก่ โรคใบไหม้ลิ้นมังกร จำนวน 1 isolate มีสาเหตุจากเชื้อ *Curvularia* sp. ได้แก่ ใบจุดบานชื่น จำนวน 3 isolate และ ฝักจุดกระเจี๊ยบแดง จำนวน 1 isolate

เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ เพี้ยนภักตร์ อุบล คือประโคน และวิรัช ชูบำรุง. 2531. โรคผลไม้ส่งออกที่เกิดโรคจากเชื้อราชนิดต่างๆ ก่อนเก็บเกี่ยว. น. 96-105. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2531. กลุ่มงานวิทยาไมโค. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

ทัศนาพร ทัศคร และ สุรภี กีรติยอังกูร. 2548. โรคดอกสนิม ดอกจุดสนิมกล้วยไม้. *ใน* โรคไม้ดอก. กลุ่มวิจัยโรคพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร. น. 6-7

นิรนาม. 2549. คู่มือเกษตรกรการปลูกข้าวฟ่างสีแดง. ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. กรมวิชาการเกษตร. 28 น.

นิยมรัฐ ไตรศรี และ ลักษณา วรรณภีร์. 2533. โรคที่สำคัญของกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออก, น. 53-56. *ใน* เอกสารประกอบการสัมนาสนทนาปัญหาโรคพืช. สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2521. โรคของซ่อนกลิ่นฝรั่งที่พบในจังหวัดเชียงใหม่. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 11 (1) : 41-49.

ปราณี ลิ่มศรีวิไล ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช และ ปรีชา สุรินทร์. 2522. การสำรวจโรคของปาล์มน้ำมันระหว่างปี 2519-2521, น. 382-389. ใน รายงานประจำปี 2522. กองวิจัยโรคพืช. กรมวิชาการเกษตร.

ปราณีต ศิริวัลลภ ทศพล วิสุทธารมณ์ ปัญญา ชยามานนท์ อนันต์ สุนทรเกษมสุข ลักษณา วรรณภีร์ และ ชำนาญ ทองกลัด. 2532. ศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชบางชนิดเพื่อป้องกันกำจัดโรคใบแห้งของแตงเทศ, น. 91-93. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ. 2532. กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผักไม้ประดับ. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

พงษ์เทพ ขจรไชยกูล. 2531. โรคยางพาราที่สำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบันและอนาคต. *ใน* การประชุมการจัดทำแนวทางในการวิจัยพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการยางในทศวรรษหน้า. สถาบันวิจัยยาง 22-25 สิหาคม 2531. (เอกสารโรเนียว).

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. ราวิทยาเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 351 หน้า.

สิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์, จุมพล สาระนาค และ อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2521. โรคดอกสนิมของกล้วยไม้สกุลหวาย, น. 83-94. *ใน* รายงานประจำปี 2521. กองวิจัยโรคพืช. กรมวิชาการเกษตร.

ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช ปราณี ลิ่มศรีวิไล วิทยา เปรมปรีดิ์ และ ปรีชา สุรินทร์. 2526. การศึกษาโรคของต้นกล้ามะพร้าวพันธุ์ลูกผสมสวี 1, น. 1189-1192. ใน รายงานผลการทดลอง พ.ศ. 2526 เล่มที่ 3. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.

Chandrasrikul, A. 1962. preliminary host list of plant diseases in Thailand. Tech. Bull. No. 9, Dept. of Agr., Bangkok. 14 p.

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

Table 1 Survey Collect and Identification of *Curvularia* spp.

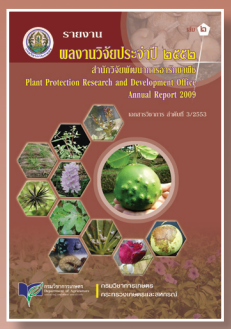
ไอโซเลท	พืช	เชื้อสาเหตุ	การทำลาย	แหล่งที่พบ
1	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	บ้านแก่งเสี้ยน อ. เมือง จ. กาญจนบุรี
2	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	ต. ปากช่อง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
3	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	ต. ซับม่วง อ. ปากช่อง. นครราชสีมา
4	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	ต. พญาเย็น อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
5	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	ต. พญาเย็น อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา
6	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. เมือง จ. พิษณุโลก
7	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. มวกเหล็ก จ. สระบุรี
8	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. พระพุทธบาท จ. สระบุรี
9	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. น้ำปาด จ. อุตรดิตถ์
10	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. เมือง จ. เชียงใหม่
11	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
12	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่
13	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. แม่ระมาด จ. ตาก
14	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. แม่สอด จ. ตาก
15	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	กิ่งอ.วังม่วง จ. สระบุรี
16	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. แม่ลาว จ.เชียงราย
17	ข้าวโพด	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. อรัญประเทศ จ. สระแก้ว

Table 1 (cont.)

ไอโซเลท	พืช	เชื้อสาเหตุ	การทำลาย	แหล่งที่พบ
18	ข้าว	*Curvularia lunata*	เมล็ด	อ. เมือง จ. ปทุมธานี
19	ข้าว	*Curvularia lunata*	เมล็ด	อ. เมือง จ. เชียงราย
20	สบู่ดำ	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. แม่ระมาด จ. ตาก
21	สบู่ดำ	*Curvularia lunata*	ใบ	จ. กรุงเทพมหานคร
22	ข้าวฟ่าง	*Curvularia lunata*	เมล็ด	อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี
23	หน้าวัว	*Curvularia lunata*	ใบ	จ. ปราจีนบุรี
24	หน้าวัว	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. เมือง จ. ลำปาง
25	เยอบีร่า	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. เมือง จ. ลำปาง
26	เยอบีร่า	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. เมือง จ. ปทุมธานี
27	เยอบีร่า	*Curvularia lunata*	ใบ	อ. สรรบุรี จ. ชัยนาท
28	ปาล์มน้ำมัน	*Curvularia eragrostidis*	ใบ	จ. กระบี่
29	กล้วยไม้สกุลหวาย	*Curvularia eragrostidis s*	ดอก	อ. สามพราน จ. นครปฐม
30	กล้วยไม้สกุลหวาย	*Curvularia eragrostidis s*	ดอก	จ, สุพรรณบุรี
31	กล้วยไม้สกุลหวาย	*Curvularia eragrostidis s*	ดอก	จ. ปราจีนบุรี
32	กล้วยไม้สกุลหวาย	*Curvularia eragrostidis s*	ดอก	อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี
33	กล้วยไม้สกุลหวายแคระ	*Curvularia eragrostidis s*	ดอก	จ. กรุงเทพมหานคร
34	กล้วยไม้สกุลออยซิเดียม	*Curvularia tuberculata*	ดอก	จ. กรุงเทพมหานคร

Table 1 (cont.)

ไอโซเลท	พืช	เชื้อสาเหตุ	การทำลาย	แหล่งที่พบ
35	แกลดดิโอลัส	*Curvularia prasadii*	ใบ	จ. ตาก
36	แกลดดิโอลัส	*Curvularia prasadii*	ใบ	อ. เมือง จ. เชียงราย
37	ลิ้นมังกร	*Curvularia pallescens*	ใบ	จ. ตาก
38	บานชื่น	*Curvularia* sp.	ใบ	อ. โคกตูม จ. ลพบุรี
39	บานชื่น	*Curvularia* sp.	ใบ	อ. เมือง จ. พระนครศรีอยุธยา
40	บานชื่น	*Curvularia* sp.	ใบ	อ. แม่ลาว จ. เชียงราย
41	กระเจี๊ยบแดง	*Curvularia* sp.	ฝัก	อ. เมือง จ.สุพรรณบุรี



ชื่อหนังสือ ผลงานวิจัยประจำปี 2552
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้จัดพิมพ์ ส่วนบริหารโครงการวิจัย
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
โทรศัพท์ 0-2579-1061, 0-2579-5583

ลิขสิทธิ์ของ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ห้ามคัดลอกข้อความ หรือส่วนใดส่วนหนึ่งของหนังสือไปเผยแพร่
และใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต

พิมพ์ครั้งที่ 1 เมื่อ กรกฎาคม 2553
จำนวนพิมพ์ 195 เล่ม
พิมพ์ที่ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด
44/16-17 ถ.เลี่ยงเมืองนนทบุรี ต.ตลาดขวัญ อ.เมือง จ.นนทบุรี 11000
โทร. 0-2525-4807-9, 0-2525-4853-4 แฟกซ์ 0-2525-4855

PLANT PROTECTION RESEARCH AND DEVELOPMENT OFFICE