รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตส้มเปลือกล่อน

2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาส้มเปลือกล่อนในเขตภาคเหนือ ระยะที่ 2

3. ชื่อการทดลอง การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ทนทาน/ต้านทานโรคกรีนนิ่งในแปลง
The Selection of Resistance hybrid OrangeVarieties to Greening Disease in the farm.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นริศรา สุวรรณ	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
ผู้ร่วมงาน	ทวีพงษ์ ณ น่าน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
	แสนชัย คำหล้า	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ทนทานหรือต้านทานโรคกรีนนิ่งในแปลง มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ส้มเปลือกล่อนให้ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง ดำเนินการในปี 2559-2563 โดยนำต้นส้มลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบในปี 2558 จำนวน 119 สายต้นมาปลูกทดสอบคัดเลือกต้นที่ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง ณ แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ไม่มีแผนการทดลองเกณฑ์การคัดเลือกสายต้นส้มที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง คือ ต้นส้มมีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0-25 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) แล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatusliberibacterasiaticus*) บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโตและอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิ่งจากการพิจารณาอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิ่งของต้นส้มลูกผสมทั้งหมดในปี 2560-2561 พบว่า ต้นส้มส่วนใหญ่มีความแข็งแรงปกติ และมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏอาการ แต่มีสายต้นที่เริ่มปรากฏอาการระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่งน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ พบทั้งหมด 18 สายต้นสายต้นที่แสดงอาการระดับ 2 คือ คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50เปอร์เซ็นต์พบทั้งหมด 3สายต้น จากนั้นในปี 2562 ได้ส่งตัวอย่างใบส้มลูกผสมทั้งหมด เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Real-time PCR จำนวน 96 ตัวอย่าง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจสอบ สามารถแบ่งกลุ่มตามปริมาณเชื้อสาเหตุได้ จำนวน 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม N ซึ่งไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง จำนวน 9 สายต้น(9.37%), กลุ่ม A ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งน้อย มีค่า CT อยู่ระหว่าง 30.00-34.99 จำนวน 12 สายต้น (12.5%), กลุ่ม B ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งปานกลาง มีค่า CT อยู่ระหว่าง 25.00-29.99 จำนวน 59 สายต้น (61.45%), กลุ่ม C ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งมาก มีค่า CT อยู่ระหว่าง 24.99-22.0 จำนวน 10 สายต้น (10.41%), และ กลุ่ม Z ซึ่งต้องทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง จำนวน 6 สายต้น (6.25%)ได้คัดเลือกต้นส้มลูกผสมในกลุ่ม A ที่เป็นโรคกรีนนิ่งน้อย และกลุ่ม N ที่ไม่พบโรคกรีนนิ่งที่สามารถให้ผลผลิตส้มลูกผสมโดยมีน้ำหนักผลต่อต้นไม่น้อยกว่า 2.5 กิโลกรัมต่อต้นขึ้นไปและมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ไม่น้อยกว่า8 องศาบริกซ์สามารถคัดเลือกได้ 13 สาย

กรมวิชาการเกษตร

ต้นส่งตรวจห้องปฏิบัติการ พบว่า ได้ต้นส้มลูกผสมที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ จำนวน 11 สายต้น ได้แก่ ExP#12, ExP#36, PxOC#14, PxOC#22, (PxKW)xP#3 (PxKW)xP#4, (PxKW)xP#12, (PxKW)xP#16, (PxKW)xP#27, (PxKW)xP#32, และ (PxKW)xP#34

จากการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ได้นี้จะนำไปทดสอบระดับความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคต่อไปในระดับห้องปฏิบัติการและแปลงทดสอบต่อไป เพื่อให้ได้ต้นส้มลูกผสมที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมได้

ABSTRACT

The selection of resistance hybrid orangevarieties to greening disease in the farm was improved of hybrid orange varieties during 2016 to 2020. Thisexperiment were conducted to hybrid orange varieties from selection of peroxidase activityand planted at Nan Agricultural Research and Development Center. The selection criteria of the experiment were tolerant to greening disease and invisible pathogen (*Candidatusliberibacterasiaticus*) by Polymerase Chain Reation technique (PCR). The result showed that,mostly clones has healthy plant and not found symptom of greening disease. Moreover, there were 18 clones in level 1 symptom and 3 clones in level 2 symptom. After that, 96 selected clones were detected of *Candidatusliberibacterasiaticus*by Real-Time PCR technique(RT-PCR). The result showed that, there were 5 group by concentrate pathogen such as group N (non-pathogen), group A (less pathogen), group B (medium pathogen), group C (intense pathogen) and group Z (Check again). Selection clones had higher yield than 2.5 kg/tree and sweetness more than 8 brix degree. There were 13 clones were selected in group N and group A to detected greening pathogen. It was found that, 11 clones werenot found greening pathogen such as ExP#12, ExP#36, PxOC#14, PxOC#22, (PxKW)xP#3 (PxKW)xP#4, (PxKW)xP#12, (PxKW)xP#16, (PxKW)xP#27, (PxKW)xP#32, and (PxKW) xP#34. This experiment will be testing tolerant level to greeningdisease in the greenhouse and farm and the experiment will have adapted of citrus varieties in appropriate environment.

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

พื้นที่ปลูกส้มเขียวหวานในเขตภาคเหนือของประเทศไทยได้ลดลงอย่างมาก โดยที่จังหวัดเชียงใหม่ลดลงจาก 93,047ไร่ ในปี 2551 เหลือเพียง 34,839ไร่ ในปี 2554 จังหวัดแพร่ลดจาก 40,000ไร่ เหลือไม่เกิน 10,000 ไร่ ในขณะที่จังหวัดน่านลดลงจาก 20,000ไร่ (ปี 2541) เหลือ 1,900 ไร่ในปัจจุบัน สำหรับจังหวัดอื่นๆ ก็มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน สาเหตุสำคัญมีหลายประการ เช่นต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ราคาส้มตกต่ำ ทำให้ผู้บริโภคหันไปนิยมส้มนำเข้าจากประเทศจีน แต่ปัจจัยสำคัญที่สุดก็คือ เกิดการระบาดของโรคกรีนนิ่ง ทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ผลผลิตลดลงจนถึงไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย (ผลส้มร่วงก่อนการเก็บเกี่ยว) จากการสำรวจการระบาดของโรคกรีนนิ่งในเขตอำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรในปี 2555 พบว่าจากพื้นที่สำรวจ 29,600ไร่ เกษตรกร 986 ราย มีถึง 91 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมดมีต้นส้มเป็นโรคกรีนนิ่งในระดับรุนแรง อย่างไรก็ตามในบางจังหวัด เช่น แพร่ น่าน และเชียงใหม่ กลับพบว่าเกษตรกรที่เคยปลูกส้มได้มีความสนใจที่จะกลับมาปลูกใหม่อีกครั้ง (จากยอดจองกล้าพันธุ์จาก ศวพ.แพร่ และศวพ.น่าน) เนื่องจากส้มมีราคาดีขึ้นมากในปัจจุบัน

โรคกรีนนิ่งเป็นโรคสำคัญที่ทำให้ส้มในหลายประเทศทั่วโลกประสบปัญหา แม้แต่ในรัฐฟลอริด้าของประเทศสหรัฐอเมริกา อุตสาหกรรมส้มในภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทยถึงกาลที่เกือบจะเรียกว่า “ล่มสลาย” ลงเป็นลำดับก็เนื่องมาจากโรคนี้ นับเนื่องมาจากส้มบางมด เพชรบูรณ์ จันทบุรี แพร่ น่าน รังสิต กำแพงเพชร (เกษตรกรส่วนใหญ่อพยพมาจากย่านรังสิต เพื่อหาแหล่งปลูกใหม่ที่น่าจะปลอดภัยจากโรคกรีนนิ่ง) และแหล่งสุดท้ายคืออำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ ที่กำลังประสบปัญหาในลักษณะเดียวกัน การที่ส้มเป็นโรคกรีนนิ่งทำให้ใบสังเคราะห์แสงได้น้อยลง การลำเลียงอาหารไปยังส่วนต่างๆ ติดขัดเนื่องจากท่ออาหาร (Phloem) อุดตันจากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง เป็นเหตุให้อาหารที่ไปเลี้ยงผลไม่เพียงพอ ผลจึงร่วงในที่สุด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าทำลายได้ง่ายและรุนแรงขึ้น เช่นโรครากเน่าโคนเน่า ทำให้ต้นส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่งมีอาการโรครากเน่าโคนเน่ารุนแรงกว่าต้นที่ไม่ติดโรค ดังนั้นนักวิชาการจากทั่วโลกตลอดจนถึงตัวเกษตรกรเองต่างก็พยายามหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้ แต่ยังไม่สามารถแก้ไขได้ผลเป็นที่น่าพอใจ จึงเป็นโอกาสให้บรรดานักฉวยโอกาสหาวิธีการสร้างความร่ำรวยบนความเดือนร้อนของเกษตรกร เช่น การหลอกขายปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพ ฮอร์โมนป้องกันผลร่วง ฯลฯ เมื่อเกษตรกรหลงเชื่อซื้อผลิตภัณฑ์ (ที่ส่วนมากมีราคาแพงเกินเหตุ) มาใช้ ระยะแรกต้นส้มอาจจะมีอาการดีขึ้นบ้าง หากแต่หลังจากนั้นอาการเดิมๆ จากโรคกรีนนิ่งก็จะกลับมาปรากฏให้เห็นอีก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้เกี่ยวข้องกับวงการส้มจะได้ช่วยกันหาวิธีป้องกันกำจัดโรคนี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการบรรเทาความเดือดร้อนของเกษตรกร แม้ว่าจะไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเบ็ดเสร็จ แต่หากสามารถยืดอายุการให้ผลผลิตออกไปได้ หรือชะลอการติดโรคกรีนนิ่งให้ช้าลงบ้างหรือสามารถประคับประคองให้ส้มทนทานโรคอยู่ได้นานขึ้น ก็น่าจะช่วยให้เกษตรกรสามารถมีชีวิตที่ดีขึ้นได้ อย่างน้อยก็เป็นการสื่อถึงเกษตรกรได้ว่า รัฐไม่ได้ทอดทิ้งให้เกษตรกรดิ้นรนต่อสู้เพียงลำพังแต่อย่างใด

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ส้มลูกผสม จำนวน 119 สายต้น ได้แก่ ExP#1-ExP#43, ExSP#1-ExSP#9, GWxKW#1-GWxKW#3, GWxSP#1-GWxSP#3, SPxGW, (PxKW)#1- (PxKW)#37 และ PxOC#1-PxOC#23

2. ปุ๋ยเคมี ได้แก่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15, 13-13-21, 46-0-0, 18-46-0 และ0-0-60

3. สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้แก่ อะบาแมกติน, ไซเปอร์เมทริน

4. วัสดุการเกษตร ได้แก่ จอบ ถุง กระสอบเวอร์เนียไม้บรรทัด ตลับเมตร เครื่องวัดความหวาน(Brix Refractometer)

วิธีการ

1.ปลูกต้นกล้าส้มลูกผสมคู่ต่างๆ ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ Peroxidase activity (การทดลองที่ 1.1)จำนวน 119 สายต้น ในแปลงทดสอบ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่านระยะปลูกระหว่างต้น 3 เมตร ระหว่างแถว 5 เมตร

2.คัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือก คือ ต้นส้มมีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลืองยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0.-25 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบในห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชด้วยเทคนิค RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) และเทคนิค PCR (*polymerase chain reaction)*แล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatusliberibacterasiaticus*)บันทึกข้อมูลอาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อโรคกรีนนิ่ง ทุก 3 เดือนและส่งวิเคราะห์ตัวอย่างใบส้มที่สงสัยว่าจะติดเชื้อกรีนนิ่งทุก 6 เดือน ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3.การบันทึกข้อมูล

1. การปฏิบัติงานภายในแปลง:การปลูก การดูแลรักษา การกำจัดวัชพืช และการเก็บเกี่ยว
2. ข้อมูลทางด้านเกษตร:การเจริญเติบโตผลผลิต ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
3. องค์ประกอบผลผลิต :ผลผลิตต่อต้น ขนาดผล จำนวนกลีบต่อผลน้ำหนักผลความหวาน (%Brix)
4. ข้อมูลทางด้านสังคม:ความพึงพอใจของผู้บริโภค
5. ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน อำเภอเมืองน่าน จังหวัดน่าน

กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ข้อมูลการเจริญเติบโตและการประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่งในต้นส้มลูกผสม

ปี 2563 ข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นส้มลูกผสม อายุ 3ปี จำนวน 96 สายต้น พบว่า สายต้นที่มีขนาดเส้นรอบวงสูงสุด คือ PxOC#6 โดยมีขนาดเส้นรอบวงของลำต้น 28.52 เซนติเมตร รองลงมาคือ PxOC#11 และ (PxKW)xP#27 มีเส้นรอบวงของลำต้น 27.2 และ 26.12 เซนติเมตร ตามลำดับสายต้นที่มีขนาดเส้นรอบวงน้อยที่สุด คือ ExP#32 มีขนาดเส้นรอบวงของลำต้น 8.64 เซนติเมตรส่วนสายต้นที่มีความสูงของลำต้นมากที่สุด คือ PxOC#4 มีความสูง 330 เซนติเมตร รองลงมา คือ (PxOC)#11 และ (PxOC)#14 มีความสูงของลำต้น 320 และ 315 เซนติเมตรตามลำดับ สายต้นที่มีความสูงของลำต้นน้อยที่สุด คือ ExP#30 มีความสูงของลำต้น 112 เซนติเมตรส่วนการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างทรงพุ่ม พบว่า สายพันธุ์ที่มีความกว้างทรงพุ่มสูงสุด คือ (PxKW)xP#32 มีความกว้างทรงพุ่ม 251.5 เซนติเมตร รองลงมาคือ สายต้น PxOC#11และPxOC#20มีความกว้างทรงพุ่ม 230และ 226เซนติเมตร ตามลำดับ สายต้นที่มีความกว้างของทรงพุ่มน้อยที่สุด คือ ExSP#2 มีความกว้างทรงพุ่ม75เซนติเมตร

การประเมินลักษณะอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิ่งของต้นส้มลูกผสม พบว่า ต้นส้มส่วนใหญ่มีความแข็งแรงปกติ และมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏอาการ แต่มีสายต้นที่เริ่มปรากฏอาการระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง< 25% พบทั้งหมด 6 สายต้น ได้แก่ ExP#4, ExP#23, ExP#32,ExP#35, ExSP#3และGWxKW#3นอกจากนี้ พบว่า มีสายต้นที่แสดงอาการระดับ 2 คือ คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50 % พบทั้งหมด 4สายต้น ได้แก่ ExP#5,ExSP#5 , ExSP#6, และExSP#7ดังตาราง (ตารางที่ 1)

ข้อมูลผลผลิตส้มลูกผสม พบว่า ส้มลูกผสมให้ผลผลิตจำนวน 63 สายต้น จากจำนวนต้นทั้งหมด 96 สายต้น หรือ 65.63% จำนวนต้นทั้งหมด สายต้นที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ PxOC#23 มีผลผลิต 14.47 กิโลกรัมต่อต้น รองลงมา คือ สายต้นPxOC#21 มีผลผลิต 11.47 กิโลกรัมต่อต้น สายต้นที่ให้ผลผลิตน้อยที่สุด คือ ExP#11 มีผลผลิต 0.13 กิโลกรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักเฉลี่ยต่อผล พบว่า สายต้นที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อผลมากที่สุด คือ PxOC#6 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อผล 26.57 กรัมต่อผล รองลงมา คือ สายต้นExP#28 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อผล 25.50 กรัมต่อผล สายต้นที่มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ (PxKW)xP#18 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อผล 11.43 กรัมต่อผล ส้มลูกผสมมีขนาดผลตั้งแต่ 24.95-36.60 มิลลิเมตร จำนวนกลีบตั้งแต่ 5-7.9 กลีบ จำนวนเมล็ด 0.75-6.30 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.60-2.9 มิลลิเมตร และมีเปอร์เซนต์บริกซ์ 8.59-13.24 เปอร์เซ็นต์

ศรีวิชากรเกษตร

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเจริญเติบโต เส้นรอบวงของลำต้น ความสูง ขนาดทรงพุ่ม และประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง ปี 2563

ลำดับ	สายต้น	เส้นรอบวงของลำต้น (ซม.)	ความสูง (ซม.)	ขนาดทรงพุ่ม (ซม.)	ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
1	ExP#1	16.9	180	145	0
2	ExP#2	-	-	-	-
3	ExP#3	17.93	245	188.5	0
4	ExP#4	13.22	135	130.5	1
5	ExP#5	10.61	130	102	2
6	ExP#6	22.18	190	149.5	0
7	ExP#7	16.53	209	143	0
8	ExP#8	15.34	190	119	0
9	ExP#9	22.23	190	200.5	0
10	ExP#10	15.83	230	135.5	0
11	ExP#11	16.92	260	130.5	0
12	ExP#12	15.22	210	120	0
13	ExP#13	16.42	181	170.5	0
14	ExP#14	-	-	-	-
15	ExP#15	-	-	-	-
16	ExP#16	19.72	235	153	0
17	ExP#17	-	-	-	-
18	ExP#18	16.47	196	140	0
19	ExP#19	16.58	195	156	0
20	ExP#20	18.23	190	180.5	0
21	ExP#21	-	-	-	-
22	ExP#22	15.58	150	117.5	0
23	ExP#23	15.96	129	138	1
24	ExP#24	-	-	-	-
25	ExP#25	19.15	180	146	0
26	ExP#26	12.92	135	118	0
27	ExP#27	14.86	140	123.5	0
28	ExP#28	20.03	202	181.5	0
29	ExP#29	19.18	235	168.5	0
30	ExP#30	13.79	112	122.5	0
31	ExP#31	16.94	212	157	0

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	เส้นรอบวงของลำต้น (ซม.)	ความสูง (ซม.)	ขนาดทรงพุ่ม (ซม.)	ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
32	ExP#32	8.64	180	59.5	1
33	ExP#33	15.07	190	146.5	0
34	ExP#34	20.54	254	190.5	0
35	ExP#35	19.13	235	172	1
36	ExP#36	14.51	180.5	145.7	0
37	ExP#37	-	-	-	-
38	ExP#38	18.75	160	170.5	0
39	ExP#39	-	-	-	-
40	ExP#40	15.32	200	163.5	0
41	ExP#41	25.57	168	165.5	0
42	ExP#42	16.50	210	165	0
43	ExP#43	18.83	258	167	0
44	ExSP#1	-	-	-	-
45	ExSP#2	12.72	160	75	0
46	ExSP#3	13.79	137	110	1
47	ExSP#4	-	-	-	-
48	ExSP#5	17.7	186	137	2
49	ExSP#6	15.51	153	102.5	2
50	ExSP#7	15.08	154	105	2
51	ExSP#8	16.12	150	140	0
52	ExSP#9	-	-	-	-
53	GWxKW#1	-	-	-	-
54	GWxKW#2	-	-	-	-
55	GWxKW#3	15.22	155	117	1
56	GWxSP#1	-	-	-	-
57	GWxSP#2	-	-	-	-
58	GWxSP#3	-	-	-	-
59	SPxGW	-	-	-	-
60	(PxKW)xP#1	-	-	-	-
61	(PxKW)xP#2	17.21	215	171	0
62	(PxKW)xP#3	20.85	234	192	0
63	(PxKW)xP#4	24.04	315	179	0
64	(PxKW)xP#5	18.22	265	187.5	0
65	(PxKW)xP#6	15.69	167	130.5	0

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	เส้นรอบวงของลำต้น (ซม.)	ความสูง (ซม.)	ขนาดทรงพุ่ม (ซม.)	ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
66	(PxKW)xP#7	-	-	-	-
67	(PxKW)xP#8	-	-	-	-
68	(PxKW)xP#9	22.35	185	185	0
69	(PxKW)xP#10	25.21	248	190	0
70	(PxKW)xP#11	16.05	180	130	0
71	(PxKW)xP#12	16.21	153	140.5	0
72	(PxKW)xP#13	18.48	201	195	0
73	(PxKW)xP#14	16.12	283	92	0
74	(PxKW)xP#15	19.72	192	174.5	0
75	(PxKW)xP#16	19.5	210	164	0
76	(PxKW)xP#17	23.02	205	173.5	0
77	(PxKW)xP#18	17.15	225	145.5	0
78	(PxKW)xP#19	17.75	275	155.2	0
79	(PxKW)xP#20	23.84	270	210	0
80	(PxKW)xP#21	18.25	195	168.5	0
81	(PxKW)xP#22	19.82	207	177	0
82	(PxKW)xP#23	15.42	168	89.5	0
83	(PxKW)xP#24	19.04	235	155	0
84	(PxKW)xP#25	19.77	235	175	0
85	(PxKW)xP#26	22.10	187	149	0
86	(PxKW)xP#27	26.12	305	198	0
87	(PxKW)xP#28	19.77	250	159.5	0
88	(PxKW)xP#29	22.3	210	155	0
89	(PxKW)xP#30	25.62	262	186	0
90	(PxKW)xP#31	24.15	225	149.5	0
91	(PxKW)xP#32	19.28	225	251.5	0
92	(PxKW)xP#33	16.33	210	167	0
93	(PxKW)xP#34	23.50	260	167	0
94	(PxKW)xP#35	20.48	225	201	0
95	(PxKW)xP#36	15.52	212	122	0
96	(PxKW)xP#37	17.21	220	170	0
97	PxOC#1	23.80	250	168.5	-
98	PxOC#2	20.85	255	210	0
99	PxOC#3	24.82	235	188.5	0

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	เส้นรอบวงของลำต้น (ซม.)	ความสูง (ซม.)	ขนาดทรงพุ่ม (ซม.)	ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
100	PxOC#4	24.04	330	170.2	0
101	PxOC#5	-	-	-	-
102	PxOC#6	28.52	250	178	0
103	PxOC#7	17.45	268	158	0
104	PxOC#8	18.82	195	133.5	0
105	PxOC#9	-	-	-	-
106	PxOC#10	25.21	306	191.5	0
107	PxOC#11	27.2	320	230	0
108	PxOC#12	16.21	210	150	0
109	PxOC#13	19.83	218	193	0
110	PxOC#14	24.36	315	150	0
111	PxOC#15	17.86	265	157	0
112	PxOC#16	23.72	240	175.5	0
113	PxOC#17	-	-	-	-
114	PxOC#18	22.58	230	183	0
115	PxOC#19	17.10	245	128	0
116	PxOC#20	17.75	245	226	0
117	PxOC#21	23.84	275	210.5	0
118	PxOC#22	22.42	287	174.5	0
119	PxOC#23	19.23	286	210	0

หมายเหตุ

1. E x P หมายถึง เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น
2. E x SP หมายถึง เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มสายน้ำผึ้ง
3. GW x KW หมายถึง Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน
4. SP x GW หมายถึง ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash
5. GW x SP หมายถึง Orange Greenwashx ส้มสายน้ำผึ้ง
6. (PxKW)xPหมายถึง (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน) x ส้มแป้น
7. P x O หมายถึง ส้มแป้น x ส้ม Ocean

-ไม่มีข้อมูลเนื่องจากต้นส้มตาย

กรมวิชาการเกษตร

การประเมินการเกิดโรค (ดัดแปลงจากสันติ และสุธามาศ, 2555)

ความรุนแรงของโรค

0 ไม่ปรากฏอาการ

1 อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง < 25%

2 อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50%

3 อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง > 50%

4 อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง > 75%

ตารางที่ 2 คุณภาพผลผลิตส้มลูกผสมในแต่ละสายต้น ณ แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ปี 2563

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
1	ExP#1	1.14	18.50	24.95	6.20	4.70	1.80	10.00
2	ExP#2	*	*	*	*	*	*	*
3	ExP#3	4.71	23.10	33.95	6.00	5.50	2.00	10.60
4	ExP#4	-	-	-	-	-	-	-
5	ExP#5	-	-	-	-	-	-	-
6	ExP#6	2.91	21.30	32.70	6.60	5.90	2.00	11.40
7	ExP#7	0.51	17.70	31.15	5.60	6.30	1.60	9.80
8	ExP#8	-	-	-	-	-	-	-
9	ExP#9	0.39	20.70	32.15	7.00	4.30	2.00	10.60
10	ExP#10	1.49	15.70	30.15	6.80	4.00	1.60	10.80
11	ExP#11	0.13	14.70	25.60	6.10	3.30	1.70	8.80
12	ExP#12	3.74	18.20	30.70	7.10	4.40	2.30	11.00
13	ExP#13	2.03	19.60	30.15	7.00	3.50	1.70	9.90
14	ExP#14	*	*	*	*	*	*	*
15	ExP#15	*	*	*	*	*	*	*
16	ExP#16	-	-	-	-	-	-	-
17	ExP#17	*	*	*	*	*	*	*
18	ExP#18	0.91	19.90	32.25	7.00	6.30	1.70	9.40
19	ExP#19	2.18	23.00	33.05	6.30	4.60	1.80	9.40
20	ExP#20	2.87	21.00	33.30	6.40	5.40	1.80	10.20
21	ExP#21	*	*	*	*	*	*	*
22	ExP#22	-	-	-	-	-	-	-
23	ExP#23	-	-	-	-	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
24	ExP#24	*	*	*	*	*	*	*
25	ExP#25	-	-	-	-	-	-	-
26	ExP#26	-	-	-	-	-	-	-
27	ExP#27	-	-	-	-	-	-	-
28	ExP#28	2.62	25.50	31.10	6.50	3.40	1.60	9.00
29	ExP#29	4.20	17.50	32.30	7.00	2.70	1.80	11.20
30	ExP#30	4.56	19.20	33.20	7.00	4.00	1.62	11.40
31	ExP#31	0.76	15.00	29.40	5.70	3.80	1.80	10.70
32	ExP#32	-	-	-	-	-	-	-
33	ExP#33	-	-	-	-	-	-	-
34	ExP#34	5.04	22.50	34.20	7.10	5.00	1.90	9.70
35	ExP#35	2.15	16.60	30.45	5.00	3.90	2.00	11.90
36	ExP#36	5.14	20.20	36.50	7.00	4.20	1.70	12.12
37	ExP#37	*	*	*	*	*	*	*
38	ExP#38	0.95	19.00	31.35	5.20	5.70	1.90	10.80
39	ExP#39	*	*	*	*	*	*	*
40	ExP#40	0.13	14.50	25.70	5.00	2.10	1.90	9.20
41	ExP#41	-	-	-	-	-	-	-
42	ExP#42	-	-	-	-	-	-	-
43	ExP#43	-	-	-	-	-	-	-
44	ExSP#1	*	*	*	*	*	*	*
45	ExSP#2	-	-	-	-	-	-	-
46	ExSP#3	-	-	-	-	-	-	-
47	ExSP#4	*	*	*	*	*	*	*
48	ExSP#5	-	-	-	-	-	-	-
49	ExSP#6	-	-	-	-	-	-	-
50	ExSP#7	-	-	-	-	-	-	-
51	ExSP#8	-	-	-	-	-	-	-
52	ExSP#9	*	*	*	*	*	*	*
53	GWxKW#1	*	*	*	*	*	*	*
54	GWxKW#2	*	*	*	*	*	*	*
55	GWxKW#3	-	-	-	-	-	-	-
56	GWxSP#1	*	*	*	*	*	*	*
57	GWxSP#2	*	*	*	*	*	*	*

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
58	GWxSP#3	*	*	*	*	*	*	*
59	SPxGW	*	*	*	*	*	*	*
60	(PxKW)xP#1	*	*	*	*	*	*	*
61	(PxKW)xP#2	1.06	20.1	32.60	6.5	5.5	1.9	8.6
62	(PxKW)xP#3	6.18	19.2	32.55	6.5	2.7	2.1	11.9
63	(PxKW)xP#4	6.98	21.70	29.0	5.8	3.7	2.2	12.7
64	(PxKW)xP#5	-	-	-	-	-	-	-
65	(PxKW)xP#6	-	-	-	-	-	-	-
66	(PxKW)xP#7	*	*	*	*	*	*	*
67	(PxKW)xP#8	*	*	*	*	*	*	*
68	(PxKW)xP#9	0.24	16	33.05	6.7	2.1	2.8	11.7
69	(PxKW)xP#10	3.35	21.8	33.20	6	4.1	2.4	10.3
70	(PxKW)xP#11	-	-	-	-	-	-	-
71	(PxKW)xP#12	4.67	20.20	36.60	6	4.1	1.9	11.2
72	(PxKW)xP#13	1.95	23.8	36.0	6.8	2.4	2.9	10.5
73	(PxKW)xP#14	-	-	-	-	-	-	-
74	(PxKW)xP#15	0.61	17.7	31.15	5.6	4.1	1.9	10.4
75	(PxKW)xP#16	4.58	19.8	32.75	6.2	3.6	2.1	12.6
76	(PxKW)xP#17	0.37	20.7	31.05	5.8	2.9	1.9	10.5
77	(PxKW)xP#18	0.26	11.43	25.20	6.9	4.4	1.5	12.3
78	(PxKW)xP#19	5.18	18.53	32.25	6.5	5.4	1.81	9.98
79	(PxKW)xP#20	1.41	18.39	32.64	6.1	4	2.27	10.31
80	(PxKW)xP#21	-	-	-	-	-	-	-
81	(PxKW)xP#22	3.2	23.75	33.85	6.9	4.9	1.89	9.44
82	(PxKW)xP#23	-	-	-	-	-	-	-
83	(PxKW)xP#24	5.38	17.51	30.09	6.7	3	1.68	11.39
84	(PxKW)xP#25	1.06	17.45	32.16	6.5	1.8	2.04	9.21
85	(PxKW)xP#26	2.53	18.4	30.07	6.7	3.1	1.92	9.86
86	(PxKW)xP#27	4.53	13.25	27.66	6.7	2.2	1.88	13.08
87	(PxKW)xP#28	-	-	-	-	-	-	-
88	(PxKW)xP#29	3.46	21.91	30.99	6.1	2.6	1.86	11.56
89	(PxKW)xP#30	3.68	18.43	30.56	6.1	3.4	2.05	11.40
90	(PxKW)xP#31	2.4	17.82	30.45	6.4	2.8	1.82	9.63
91	(PxKW)xP#32	6.98	18.68	31.31	6.2	3.1	1.78	10.48

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
92	(PxKW)xP#33	0.31	18.74	30.78	6	2.8	1.78	10.86
93	(PxKW)xP#34	4.92	20.66	32.68	7.1	3.9	1.87	12.13
94	(PxKW)xP#35	8.52	24.01	33.74	6	2.1	2.1	10.05
95	(PxKW)xP#36	2.05	14.07	28.24	6	0.75	1.63	9.77
96	(PxKW)xP#37	1.02	17.7	30.56	6.5	4.2	2.17	11.02
97	PxOC#1	-	-	-	-	-	-	-
98	PxOC#2	7.41	23.02	33.86	7	1.2	2.53	10.63
99	PxOC#3	-	-	-	-	-	-	-
100	PxOC#4	2.05	19.68	33.81	7	2	2.39	11.18
101	PxOC#5	*	*	*	*	*	*	*
102	PxOC#6	9.27	26.57	36.07	7.6	2.6	2.14	9.55
103	PxOC#7	2.21	21.13	33.41	6.2	3.4	2.2	11.22
104	PxOC#8	0.2	20.74	31.99	6.2	2.5	2.48	9.81
105	PxOC#9	*	*	*	*	*	*	*
106	PxOC#10	2.1	20.63	33.56	7	3	2.19	10.88
107	PxOC#11	-	-	-	-	-	-	-
108	PxOC#12	0.4	20.15	31.34	7.9	4.9	1.76	8.59
109	PxOC#13	-	-	-	-	-	-	-
110	PxOC#14	4.36	16.85	30.95	7	4	1.86	10.06
111	PxOC#15	1.92	20.5	33.72	7.1	4.1	2.3	9.17
112	PxOC#16	-	-	-	-	-	-	-
113	PxOC#17	*	*	*	*	*	*	*
114	PxOC#18	3.65	19.14	32.94	7	4	1.86	13.24
115	PxOC#19	0.79	22.06	32.52	7.1	4.68	1.85	9.48
116	PxOC#20	4.41	19.81	32.14	7.3	2.4	2.24	9.91
117	PxOC#21	11.68	24.25	36.11	6.2	3.4	1.98	10.2
118	PxOC#22	4.46	24.32	28.83	6.5	2.53	1.76	10.15
119	PxOC#23	14.47	22.94	29.83	7.1	1.8	1.76	9.18

หมายเหตุ

-ไม่มีข้อมูลเนื่องจากไม่มีผลผลิต

* ไม่มีข้อมูลเนื่องจากต้นส้มตาย

กรมวิชาการเกษตร

2. การตรวจโรคกรีนนิ่ง

การตรวจปริมาณของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งที่พบในต้นส้มลูกผสม โดยใช้เทคนิค Real-time PCR (RT-PCR) ตรวจตัวอย่างใบส้มทั้งหมด จำนวน 96 ต้น โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจสอบ พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตามปริมาณเชื้อสาเหตุได้ จำนวน 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม N ซึ่งไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง จำนวน 9 สายต้น(9.37%), กลุ่ม A ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งน้อย มีค่า CT อยู่ระหว่าง 30.00-34.99 จำนวน 12 สายต้น (12.5%), กลุ่ม B ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งปานกลาง มีค่า CT อยู่ระหว่าง 25.00-29.99 จำนวน 59 สายต้น (61.45%), กลุ่ม C ซึ่งเป็นโรคกรีนนิ่งมาก มีค่า CT อยู่ระหว่าง 24.99-22.0 จำนวน 10 สายต้น (10.41%), และกลุ่ม Z ซึ่งต้องทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง จำนวน 6 สายต้น (6.25%)(ตารางที่ 3)

จากการส่งตัวอย่างใบส้มจากต้นส้ม คัดเลือกต้นส้มลูกผสมจากต้นที่ไม่ปรากฏอาการของโรคและตรวจพบเป็นโรคกรีนนิ่งน้อย คือ กลุ่ม A ที่เป็นโรคกรีนนิ่งน้อย และกลุ่ม N ที่ไม่พบโรคกรีนนิ่งและให้ผลผลิตส้มลูกผสมโดยมีน้ำหนักผลต่อต้นไม่น้อยกว่า 2.5 กิโลกรัมต่อต้นขึ้นไปและมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ไม่น้อยกว่า 8 องศาบริกซ์ ผลการคัดเลือก สามารถคัดเลือกได้ 13 สายต้น ได้แก่ ExP#12, ExP#36, (PxKW)xP#3, (PxKW)xP#4, (PxKW)xP#12, (PxKW)xP#16, (PxKW)xP#27, (PxKW)xP#32, (PxKW)xP#34, PxOC#4, PxOC#14, PxOC#15 และ PxOC#22 ส่งตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCR โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจ พบว่า มีเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง 2 สายต้น คือ PxOC#4, PxOC#15 จากนั้นได้เก็บตัวอย่างใบส้มจากต้นส้มลูกผสมต้นเดิม ส่งตรวจซ้ำอีกครั้ง เพื่อยืนยันผลครั้งที่ 1 ปรากฏผลที่ได้ยังเป็นเช่นเดิม

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 จำแนกกลุ่มตัวอย่างตามปริมาณเชื้อสาเหตุที่ตรวจพบด้วยวิธี Real-time PCR (RT-PCR) จำนวน 5 กลุ่ม

กลุ่ม / ลำดับ	N	A	B	C	Z
1	ExP#5	ExP#36	ExP#1	ExP#10	ExP#4
2	ExP#12	(PxKW)xP#3	ExP#3	ExP#27	ExP#6
3	ExP#30	(PxKW)xP#4	ExP#7	ExP#32	ExSP#3
4	ExSP#2	(PxKW)xP#13	ExP#8	ExP#33	PxOC#3
5	GWxKW#3	(PxKW)xP#16	ExP#9	ExP#42	PxOC#12
6	(PxKW)xP#6	(PxKW)xP#23	ExP#11	ExP#43	PxOC#20
7	(PxKW)xP#12	(PxKW)xP#27	ExP#13	ExSP#5	
8	(PxKW)xP#34	(PxKW)xP#32	ExP#16	ExSP#6	
9	PxOC#14	PxOC#4	ExP#18	ExSP#7	
10		PxOC#15	ExP#19	(PxKW)xP#31	
11		PxOC#16	ExP#20		
12		PxOC#22	ExP#22		
13			ExP#23		
14			ExP#25		
15			ExP#26		
16			ExP#28		
17			ExP#29		
18			ExP#31		
19			ExP#34		
20			ExP#35		
21			ExP#38		
22			ExP#40		
23			ExP#41		
24			ExSP#8		
25			(PxKW)xP#2		
26			(PxKW)xP#5		
27			(PxKW)xP#9		
28			(PxKW)xP#10		
29			(PxKW)xP#11		
30			(PxKW)xP#14		
31			(PxKW)xP#15		
32			(PxKW)xP#17		

กรมวิชาการเกษตร

กลุ่ม / ลำดับ	N	A	B	C	Z
33			(PxKW)xP#18		
34			(PxKW)xP#19		
35			(PxKW)xP#20		
36			(PxKW)xP#21		
37			(PxKW)xP#22		
38			(PxKW)xP#24		
39			(PxKW)xP#25		
40			(PxKW)xP#26		
41			(PxKW)xP#28		
42			(PxKW)xP#29		
43			(PxKW)xP#30		
44			(PxKW)xP#33		
45			(PxKW)xP#35		
46			(PxKW)xP#36		
47			(PxKW)xP#37		
48			PxOC#1		
49			PxOC#2		
50			PxOC#6		
51			PxOC#7		
52			PxOC#8		
53			PxOC#10		
54			PxOC#11		
55			PxOC#13		
56			PxOC#18		
57			PxOC#19		
58			PxOC#21		
59			PxOC#23		

กรมวิชาการเกษตร

หมายเหตุ

A มีค่า CT อยู่ระหว่าง 30.00 – 34.99 (เป็นโรคกรีนนิ่ง) น้อย

B มีค่า CT อยู่ระหว่าง 25.00 – 29.99 (เป็นโรคกรีนนิ่ง) ปานกลาง

C มีค่า CT อยู่ระหว่าง 24.99 – 22.0 (เป็นโรคกรีนนิ่ง) มาก

N มีค่า CT อยู่ระหว่าง > 37.00 (ไม่เป็นโรคกรีนนิ่ง)

Z ต้องทำการตรวจซ้ำ

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การคัดเลือกต้นส้มที่ต้านทานหรือทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง โดยวิธีการปลูกต้นส้มลูกผสมทั้งหมดที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ Peroxidase activity (การทดลองที่ 1.1)จำนวน 119 สายต้น ในแปลงทดสอบ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน แล้วสังเกตอาการที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคร่วมกับการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคโดยใช้เทคนิค Real-time PCR (RT-PCR) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้พัฒนามาจากวิธี PCR เป็นการตรวจวัดดีเอ็นเอเชิงปริมาณ สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างรวดเร็วถูกต้องแม่นยำ แม้ว่าจะมีปริมาณเชื้อเพียงเล็กน้อย หรือแม้กระทั่งต้นส้มไม่แสดงอาการของโรคก็สามารถตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคกรีนนิ่งได้(ดารุณี, 2555)

จากการคัดเลือกต้นส้มที่ต้านทานหรือทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง พบว่า สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งตามเกณฑ์ คือ ได้ต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของโรคหรือปรากฏอาการใบมีขนาดเล็ก สีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0-25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatusliberibacterasiaticus*) ทั้งนี้ต้องเป็นต้นที่สามารถให้ผลผลิตส้มลูกผสมโดยมีน้ำหนักผลต่อต้นไม่น้อยกว่า 2.5 กิโลกรัมต่อต้นขึ้นไปและมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ไม่น้อยกว่า 8 องศาบริกซ์สามารถคัดเลือกต้นที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ดังกล่าว ได้จำนวน 11 สายต้น ได้แก่ ExP#12, ExP#36, (PxKW)xP#3, (PxKW)xP#4, (PxKW)xP#12, (PxKW)xP#16, (PxKW)xP#27, (PxKW)xP#32, (PxKW)xP#34, PxOC#14 และ PxOC#22จากการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ได้นี้จะนำไปทดสอบระดับความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคต่อไปในระดับห้องปฏิบัติการ แปลงทดสอบและแปลงเกษตรกรต่อไป เพื่อให้ได้ต้นส้มลูกผสมที่มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นักวิชาการเกษตร หรือผู้สนใจสามารถนำวิธีการคัดเลือกต้นส้มที่ต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งโดยวิธีการประเมินอาการที่สัมพันธ์กับโรคจากต้นส้มร่วมกับการตรวจเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิคทางอนูวิทยา ได้แก่ RT-PCRและ PCR เพื่อตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคกรีนนิ่งร่วมด้วย สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว ทำให้สามารถกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคได้อย่างรวดเร็วและลดการแพร่ระบาดของโรคได้

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ที่ร่วมปฏิบัติงานและเก็บข้อมูลในการทดสอบนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรที่ให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งในห้องปฏิบัติการ จนการทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศรีวิชาการเกษตร

12. เอกสารอ้างอิง

ดารุณี ปุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันติวานิช และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter* species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR Detection *CandidatusLiberibacter* species cause of Huanglongbing (Greening) disease by Real-time PCR. รายงานผลงานวิจัยประจ าปี ๒๕๕๕ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 2460-2463.

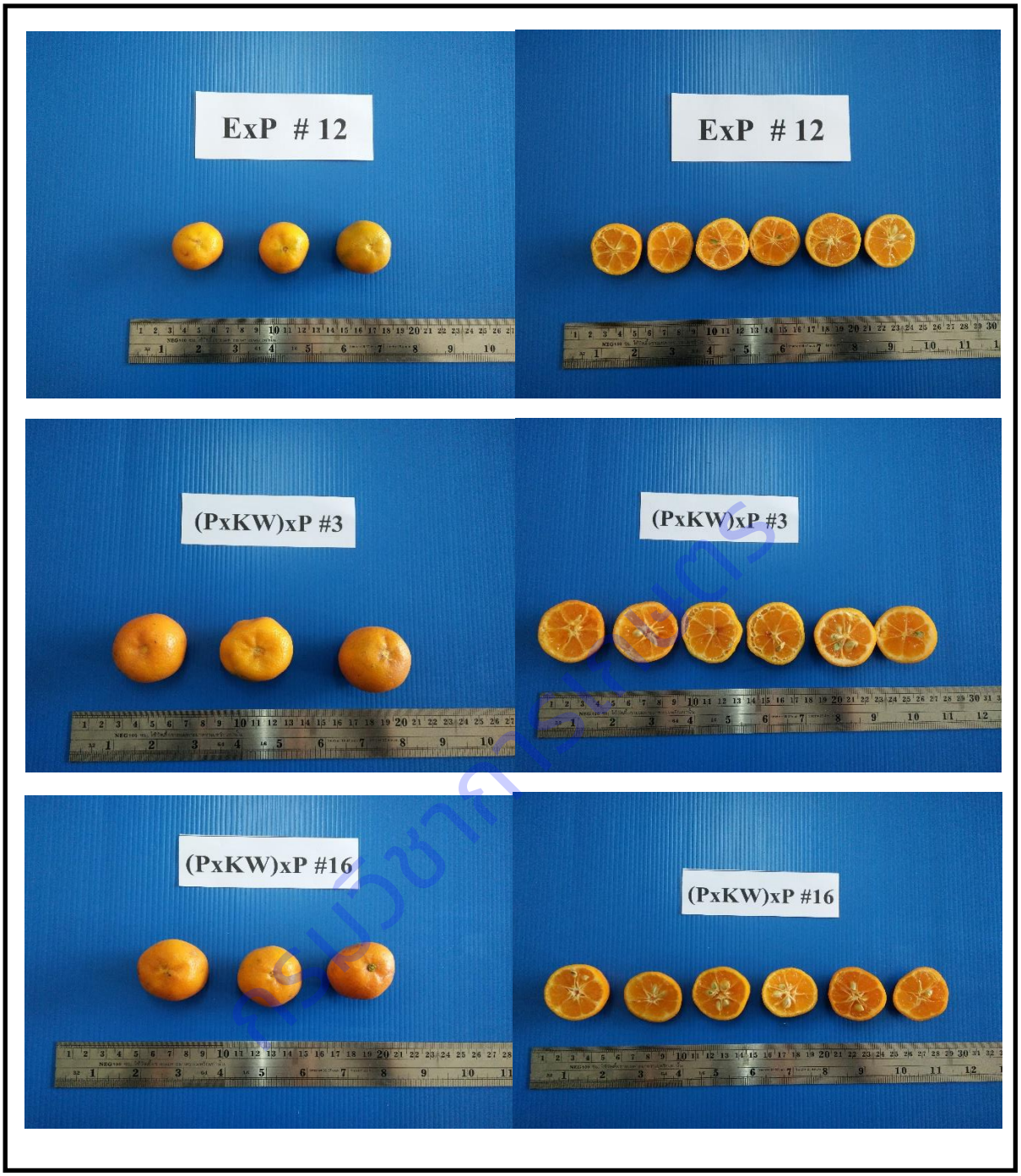
สันติ โยธาราษฎร์ และ สุธามาศ ณ น่าน. ไม่ระบุปีที่พิมพ์. โรคกรีนนิ่งในส้มโออำเภอเวียงแก่น. ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่.

ภาคผนวก

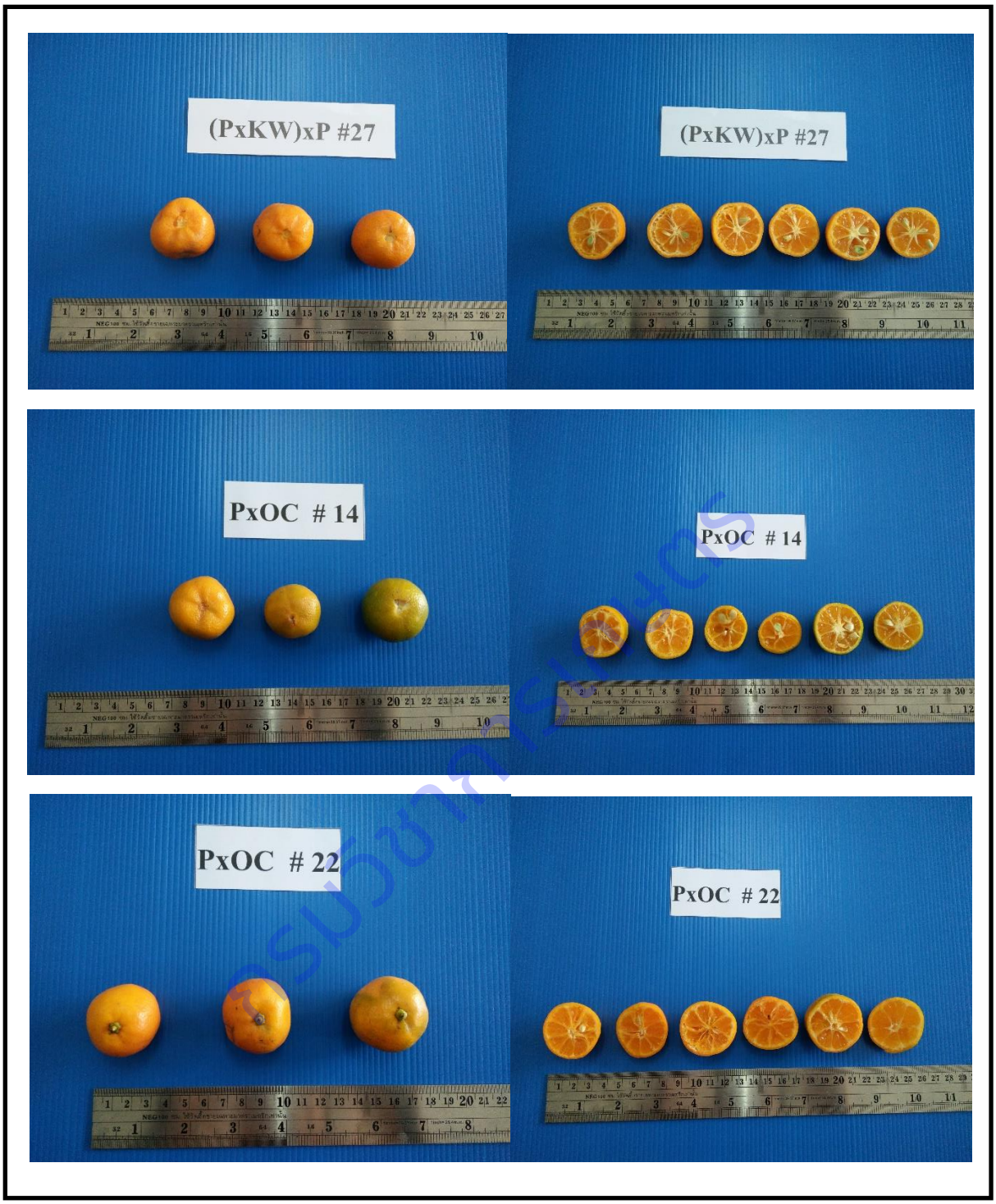
ภาพผนวกที่ 1 ต้นส้มลูกผสมที่แสดงอาการปกติ ไม่ปรากฏอาการของโรคกรีนนิ่งในแปลง ศวพ.น่าน ก.ต้นส้มสายพันธุ์ (PxKW)xP#29 ข. ต้นส้มสายพันธุ์ ExP#20

ภาพผนวกที่ 2ต้นส้มลูกผสมสายต้น GWxSP#1 เริ่มแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งอยู่ในระดับ 1 ใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง < 25%ในแปลง ศวพ.น่าน

ภาพผนวกที่ 3ต้นส้มลูกผสมสายต้น ExSP#9 เริ่มแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งอยู่ในระดับ 1 ใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50%ในแปลง ศวพ.น่าน



ภาพผนวกที่ 4 ลักษณะภายนอกและภายในผลส้มลูกผสมสายต้น ExP#12, (PxKW)xP#3 และ (PxKW)xP#16



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะภายนอกและภายในผลส้มลูกผสมสายต้น (PxKW)xP#27, PxOC#14และ PxOC#22

1. การตรวจโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Real Time polymerase chain reaction หรือ quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) คือกระบวนการขยายเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจาก DNA เป้าหมาย โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (Primer) 1 คู่ ร่วมกับตัวตรวจจับ (probe) ที่ถูกออกแบบเป็นสายสั้นๆ ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อเป้าหมายที่ต้องการตรวจ ดำเนินการด้วยวงจรของระดับอุณหภูมิต่างๆ ที่กำหนดในเครื่อง real time PCR สำหรับ probe มีการติดสี Fluorescence ซึ่งเป็นตัวตรวจจับผลของ PCR product ที่เกิดขึ้นโดยไม่ต้องนำไปผ่านเทคนิค gel electrophoresis

2. การตรวจโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบส้ม

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส้มด้วยวิธี CTAB buffer โดยตัดตัวอย่างใบส้มที่สุ่มมาจากแปลงทดสอบ เฉพาะส่วนของเส้นกลางใบ น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม บดในโกร่งให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 หรือ 2% 2-mercaptoethanolและ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

วิธีการตรวจสอบการเชื้อโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Jagoueixet. al. (1996)ด้วยคู่ไพร์เมอร์ OI1 และ OI2c ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,160 เบส

ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ดังนี้

OI :5’-GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA-3’

OI2c :5’-GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T-3’

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH2O) 7.0 ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร

- ไพรเมอร์ forward (OI1) (10pmol) 1.0 ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (OI2c) (10pmol) 1.0 ไมโครลิตร
- Green master mix 10.0 ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ 1.0 ไมโครลิตร

รวม 20.0 ไมโครลิตร

นำส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR มาผสมกันแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: 94°C นาน 2 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 2: 94°C นาน 40 วินาที

ขั้นที่ 3: 60°C นาน 1 นาที

ขั้นที่ 4: 72°C นาน 1 นาที (ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ

ขั้นที่ 5: 72°C นาน 10 นาที 1 รอบ

ขั้นที่ 6: 15°C นาน 15 นาที 1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 1 kb DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

ภาพผนวกที่ 6ภาพเจล (1% agarose gel) จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย '*Ca.* L. asiaticus' ด้วยเทคนิค PCRโดยใช้คู่ไพร์เมอร์ OI1/OI2c ของตัวอย่างใบส้มจากแปลงทดสอบของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน

M = 1kb DNA Ladder (fermentas®)

1 – 40คือ ตัวอย่างส้มจากแปลงทดสอบพันธุ์

P = Positive control

ผลการตรวจสอบ

พบว่าตัวอย่างที่เลือกเก็บมาตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรีย '*Ca.* L. asiaticus' สาเหตุของโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค PCRทั้งหมด 40 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย '*Ca.* L. asiaticus' ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเป็นโรคกรีนนิ่ง จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างหมายเลข 24 (แป้นxเขียวหวาน ชร.), 34 (PxOC#4) และ 37 (PxOC#15) ซึ่งจะปรากฏแถบดีเอ็นขนาด 1,160 bp บน 1% agarose gel

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาจากสถานีตรวจอากาศจังหวัดน่าน ปี 2562

เดือน	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	จำนวนวันที่ฝนตก	ปริมาณน้ำฝน (มม.)	ความเร็วลมเฉลี่ย (นอต)
	สูงสุด	ต่ำสุด				
มกราคม	31.12	17.91	93.71	2	89.2	4.3
กุมภาพันธ์	35.04	17.16	92.89	2	3.3	4.4
มีนาคม	37.32	19.55	87.16	2	3.9	5.8
เมษายน	39.42	23.17	84.23	6	65.6	6.5
พฤษภาคม	38.41	25.60	83.74	9	158.4	6.6
มิถุนายน	35.54	25.65	89.47	13	137.4	5.9
กรกฎาคม	33.55	25.08	88.90	14	225.6	5.1
สิงหาคม	32.09	24.71	94.45	25	440.1	5.2
กันยายน	33.60	22.40	93.43	15	91.1	5.1
ตุลาคม	34.30	23.00	94.81	7	59.5	5.5
พฤศจิกายน	32.70	20.10	95.30	1	0.9	4.9
ธันวาคม	30.50	14.40	95.70	0	0.2	4.2

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 2ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาจากสถานีตรวจอากาศจังหวัดน่าน ปี 2563

เดือน	อุณหภูมิเฉลี่ย (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)	จำนวนวันที่ฝนตก	ปริมาณน้ำฝน (มม.)	ความเร็วลมเฉลี่ย (นอต)
	สูงสุด	ต่ำสุด				
มกราคม	32.2	15.0	74.13	0	0.0	7.5
กุมภาพันธ์	33.3	14.7	67.12	1	0.3	10.1
มีนาคม	37.3	19.0	62.43	2	9.2	11.0
เมษายน	36.9	22.2	62.97	7	109.4	13.5
พฤษภาคม	37.1	24.4	70.64	10	135.0	12.1
มิถุนายน	33.5	24.7	78.43	16	148.4	11.3
กรกฎาคม	33.4	24.5	79.02	11	85.4	9.9
สิงหาคม	30.8	24.2	86.53	23	395.5	9.7
กันยายน	31.8	24.2	85.12	18	147.1	10.1
ตุลาคม	30.7	22.1	83.15	8	9.8	9.0
พฤศจิกายน	31.7	19.0	78.50	1	0.4	8.5
ธันวาคม	29.6	14.2	76.20	0	0.0	8.8

กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร