

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตส้มเปลือกก่อน
2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาส้มเปลือกก่อนในเขตภาคเหนือ ระยะที่ 2
3. ชื่อการทดลอง การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิงในแปลงเกษตรกร (ปี 2558 – 2563 : 6 ปี)

Tests of Orange, Tangerine and Sai Namphung Orange hybrid varieties are resistant to disease. Greening in the farmer's field

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	ทวีพงษ์ ภู น่าน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
ผู้ร่วมงาน	นริศรา สุวรรณ แสนชัย คำหล้า ปฏิพัทธ์ ใจปิน กรกช จันทร	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่

5. บทคัดย่อ

การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และ ส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิงในแปลงเกษตรกร โดยการนำเอาลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ส้มแป้น กับส้มสายน้ำผึ้ง และลูกผสมระหว่างสายพันธุ์ส้มแป้นกับส้มเขียวหวาน ส้มเขียวหวาน ส้มสายน้ำผึ้งปลูกทดสอบในแปลงเกษตรกร จังหวัดน่าน จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดเชียงราย สายต้นละ 50 ต้น ต่อแปลง ไม่มีแผนการทดลอง พบว่า ปี 2563 ข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นส้มลูกผสม อายุ 4 ปี พบว่าในแปลงเกษตรกรจังหวัดน่านลูกผสมแป้นxสายน้ำผึ้งมีความสูง 281 ซม. ขนาดของทรงพุ่ม มีขนาด 272 ซม. สูงที่สุด ขนาดรอบลำต้น พบว่าเขียวหวานมีขนาด 21 ซม. สูงที่สุด ในแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีความสูง 228 ซม. ขนาดของทรงพุ่ม มีขนาด 192 ซม. ขนาดรอบลำต้น มีขนาด 30.92 ซม. สูงที่สุด แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงรายลูกผสมแป้นx เขียวหวาน ความสูง 215 ซม. ขนาดของทรงพุ่ม ลูกผสมแป้นx เขียวหวานมีขนาด 138 ซม. ขนาดรอบลำต้น พบว่าลูกผสมแป้นxเขียวหวานมีขนาด 22.23 ซม.

การประเมินลักษณะอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิงของต้นส้มลูกผสม พบว่า ส้มลูกผสมแป้นXสายน้ำผึ้งและมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏอาการ ส้มลูกผสมแป้นXเขียวหวานมีระดับความรุนแรงโรคอยู่ในระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิง < 25% ส้มสายน้ำผึ้งและส้มเขียวหวานมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 1

สำหรับคุณภาพของผลผลิตของต้นส้มลูกผสม อายุ 4 ปี พบว่าในแปลงเกษตรกรจังหวัดน่านลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 38.4 กก. น้ำหนักต่อผล 87.3 กรัม ขนาดผล 58.7 มม. ความหวาน 11.4 บริกซ์ (%) ลูกผสมแป้นx เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 30.4 กก. น้ำหนักต่อผล 108.1

กรัม ขนาดผล 63.2 มม. ความหวาน 12.5 บริกซ์ (%) เชี่ยวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 32.0 กก. น้ำหนักต่อผล 108.5 กรัม ขนาดผล 59.6 มม. ความหวาน 11.1 บริกซ์ (%)

ในแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 42.5 กก. น้ำหนักต่อผล 95.5 กรัม ขนาดผล 65.7 มม. ความหวาน 13.4 บริกซ์ (%) ลูกผสมแป้นx เชี่ยวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 35.4 กก. น้ำหนักต่อผล 110.1 กรัม ขนาดผล 64.2 มม. ความหวาน 13.7 บริกซ์ (%) เชี่ยวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 35.5 กก. น้ำหนักต่อผล 92.0 กรัม ขนาดผล 59.3 มม. จำนวนความหวาน 14.5 บริกซ์ (%)

แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงรายลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 23.5 กก. น้ำหนักต่อผล 36.0 กรัม ขนาดผล 40.0 มม. ความหวาน 15.5 บริกซ์ (%) ลูกผสมแป้นx เชี่ยวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 27.5 กก. น้ำหนักต่อผล 80.0 กรัม ขนาดผล 54 มม. ความหวาน 17.4 บริกซ์ (%) เชี่ยวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 25.4 กก. น้ำหนักต่อผล 50.4 กรัม ขนาดผล 43.0 มม. ความหวาน 17.4 บริกซ์ (%))

ผลการตรวจโรคกรีนนิงของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR ครั้งที่ 1 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจำนวนสายพันธุ์ละ 3 ต้นทั้งสามสถานที่จำนวนทั้งสิ้น 27 สายต้น ในวันที่ 23 มิ.ย. 63 คัดเลือกต้นที่ไม่ปรากฏอาการคล้ายโรคกรีนนิง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจพบว่า ทั้ง 27 สายต้นไม่พบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิง

การตรวจโรคกรีนนิงของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR ครั้งที่ 2 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจำนวนสายพันธุ์ละ 3 ต้นโดยเก็บตัวอย่างจากต้นเดิมทั้งสามสถานที่จำนวนทั้งสิ้น 27 สายต้น ในวันที่ 18 ส.ค. 63 คัดเลือกต้นที่ไม่ปรากฏอาการคล้ายโรคกรีนนิง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจพบว่า ทั้ง 27 สายต้นพบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิง จำนวน 1 สายต้นคือลูกผสมแป้นx เชี่ยวหวานต้นที่ 3

จากการส่งผลส้มลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง และ ลูกผสมแป้น X เชี่ยวหวาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Bata-carotene และ Vitamin C ผลการวิเคราะห์ Bata-carotene และ Vitamin C พบว่า ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง มีปริมาณ Bata-carotene 101.42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ และ Vitamin C มีปริมาณ 8.78 $\text{mg}/100\text{g}$ ลูกผสมแป้นx เชี่ยวหวาน มีปริมาณ Bata-carotene 108.29 $\mu\text{g}/100\text{g}$ และ Vitamin C มีปริมาณ 9.78 $\text{mg}/100\text{g}$

ABSTRACT

Tests of Orange, Tangerine and Sai Namphung Orange Hybrids are resistant to disease. Greening in the farmer's field By bringing a hybrid between the species Som Paen With Sai Nam Phueng orange And a hybrid between Som Pan and tangerine, tangerine, tangerine, Sai Nam Phueng orange, planted for testing in a farmer's plot of Nan Chang Huat, Chiang Mai Chiang Rai province, 50 trees per plot, no experimental plan, found that in 2020, data on the growth of 4-year-old hybrids found that in Nan hybrids x Sai Nam Phueng has a height of 281 cm, the size of the canopy is 272 cm, the tallest, the size around the trunk is 21 cm tall, the highest in the Chiang Mai farmer plots. Sai Nam Phueng has a height of 228 cm, the size of the canopy is 192 cm, the size around the trunk is 30.92 cm, the highest. Height 215 cm. The size of the canopy of the Phan x Khian, 138 cm. It was found that the Pan x Kiew Wan hybrids had a size of 22.23 cm.

Evaluation of symptoms associated with greening disease of hybrid citrus trees showed that the X, Honeysuckle hybrids and had a 0 level of disease severity, ie asymptomatic. The severity of the severity of the disease was level 1, ie, the leaves were yellow in size, the apex was erect, and the tree was deteriorated from greening disease <25%.

The yield quality of 4-year hybrid citrus trees was found that in Nan hybrids of Pan x Sai Nam Phueng has fruit weight per plant of 38.4 kg. Weight per fruit 87.3 g. Fruit size 58.7 mm. Sweetness 11.4 brix (%). Pan x Kiew Wan hybrids have fruit weight per plant of 30.4 kg. Weight per fruit 108.1 g. Fruit size. 63.2 mm. Sweetness 12.5 brix (%). Tangerine fruit weight per plant amount 32.0 kg. Weight per fruit 108.5 g. Fruit size 59.6 mm.

In Chiang Mai Farmers Plot, Pan x hybrids Sai Nam Phueng has fruit weight per plant of 42.5 kg. Weight per plant 95.5 g. Fruit size 65.7 mm. Sweetness 13.4 brix (%). Pan x Kiew Wan hybrids have fruit weight per plant of 35.4 kg. Weight per fruit 110.1 g. Fruit size. 64.2 mm. Sweetness 13.7 brix (%). Tangerine with fruit weight per plant amount 35.5 kg. Weight per fruit 92.0 g. Fruit size 59.3 mm. Number of sweetness 14.5 brix (%).

Chiang Rai Farmer's Plot x Sai Nam Phueng has fruit weight per plant of 23.5 kg. Weight per plant 36.0 g. Fruit size 40.0 mm. Sweetness 15.5 brix (%). Pan x Kiew Wan hybrids have fruit weight per plant of 27.5 kg. Weight per fruit 80.0 g. Fruit size. 54 mm., Sweetness 17.4 brix

(%), tangerine with fruit weight per plant 25.4 kg. Weight per fruit 50.4 g. Fruit size 43.0 mm. Sweetness 17.4 brix (%).

The results of greening disease test of hybrid oranges in farmers plots using Real-time PCR technique 1 time from sampling of orange leaves from 3 strains from all three sites, totaling 27 trees on June 23. Kor. 63 selected plants with no symptoms similar to greening disease. By the Office of Plant Protection Research and Development, it was found that all 27 trees did not find the causative agent of Greening Disease.

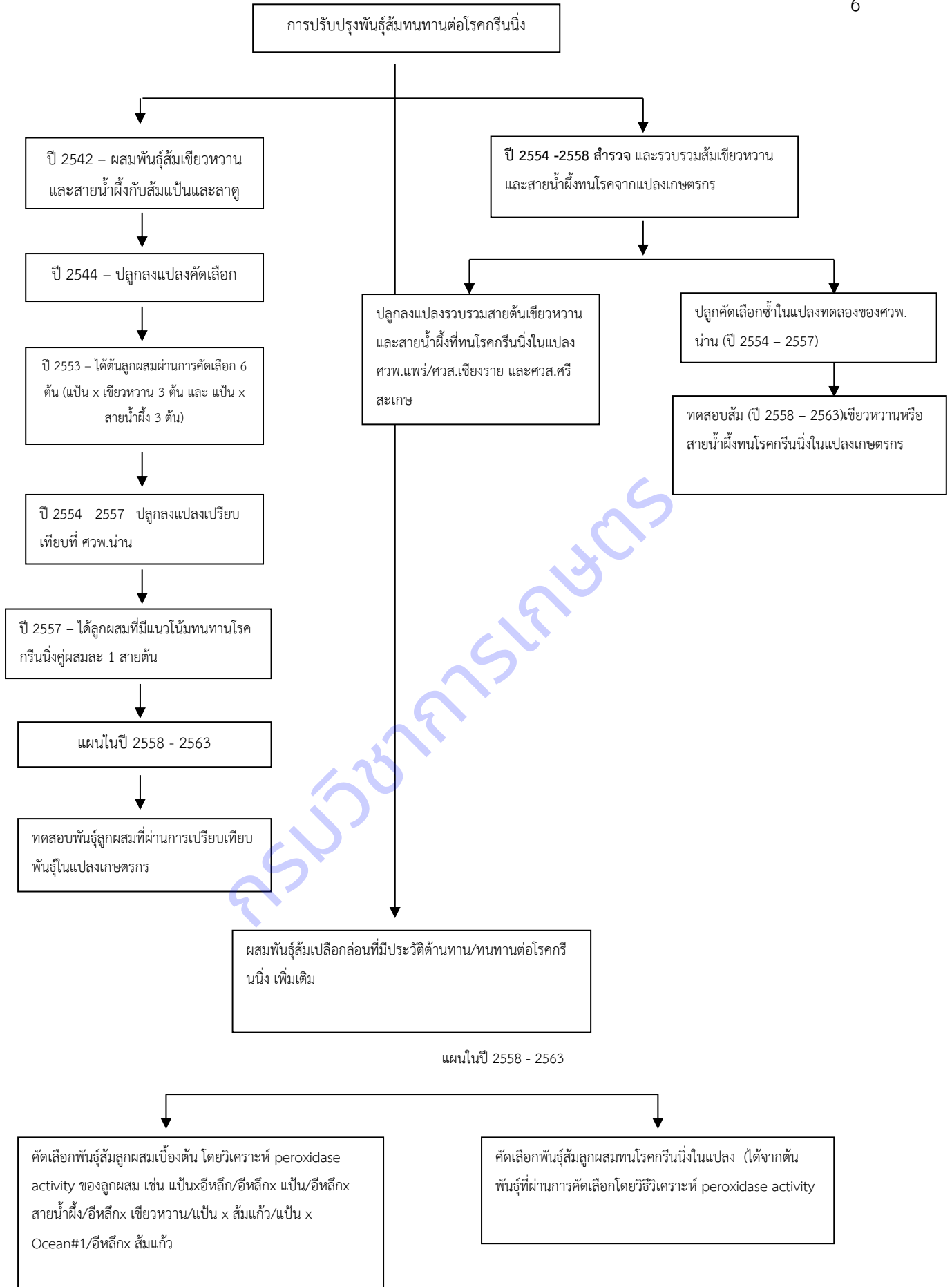
The second real-time PCR test for Greening Disease in the Farmers Plot was sampling from 3 citrus leaves per strains. On 18 Aug '20, selected trees with no symptoms similar to Greening disease. By the Office of Plant Protection Research and Development, it was found that all 27 strains found one of the causative agents of Greening Disease, namely the 3rd Pan x Kiew Wan hybrid

From the delivery of the fruit, the X-Phaeng Phaen, and the Pan X-Tianwan hybrids to analyze the quantity Bata-carotene and Vitamin C analysis results Bata-carotene and Vitamin C showed that the Phan x Honeysuckle had Bata-carotene 101.42 μg / 100g and Vitamin C at 8.78 mg / 100g.

6. คำนำ

พื้นที่ปลูกส้มเขียวหวานในเขตภาคเหนือของประเทศไทยได้ลดลงอย่างมาก โดยที่จังหวัดเชียงใหม่ ลดลงจาก 93,047ไร่ ในปี 2551 เหลือเพียง 34,839ไร่ ในปี 2554 จังหวัดแพร่ลดลงจาก 40,000ไร่ เหลือไม่เกิน 10,000ไร่ ในขณะที่จังหวัดน่านลดลงจาก 20,000ไร่ (ปี 2541) เหลือ 1,900 ไร่ในปัจจุบัน สำหรับจังหวัดอื่นๆ ก็มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน สาเหตุสำคัญมีหลายประการ เช่นต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ราคาสัมตกต่ำ ทำให้ผู้บริโภคนำไปนิยมสัมนำเข้าจากประเทศจีน แต่ปัจจัยสำคัญที่สุดก็คือ เกิดการระบาดของโรครีกรีนนิ่ง ทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ผลผลิตลดลงจนถึงไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย (ผลส้มร่วงก่อนการเก็บเกี่ยว) จากการสำรวจการระบาดของโรครีกรีนนิ่งในเขตอำเภอฝาง แม่ฮาย และไชยปราการ โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรในปี 2555 พบว่าจากพื้นที่สำรวจ 29,600ไร่ เกษตรกร 986 ราย มีถึง 91 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมดมีต้นส้มเป็นโรครีกรีนนิ่งในระดับรุนแรง อย่างไรก็ตามในบางจังหวัด เช่นแพร่ น่าน และเชียงใหม่ กลับพบว่าเกษตรกรที่เคยปลูกส้มได้มีความสนใจที่จะกลับมาปลูกใหม่อีกครั้ง (จากยอดจองกล้าพันธุ์จาก ศวพ.แพร่และศวพ.น่าน) เนื่องจากส้มมีราคาดีขึ้นมากในปัจจุบัน

โรครีกรีนนิ่งเป็นโรคสำคัญที่ทำให้ส้มในหลายประเทศทั่วโลกประสบปัญหา แม้แต่ในรัฐฟลอริดาของประเทศสหรัฐอเมริกา อุตสาหกรรมส้มในภาคเหนือและภาคกลางของประเทศไทยถึงกาลที่เกือบจะเรียกว่า “ล่มสลาย” ลงเป็นลำดับก็เนื่องมาจากโรคนี้นับเนื่องมาจากส้มบางมด เพชรบูรณ์ จันทบุรี แพร่ น่าน รังสิต กำแพงเพชร (เกษตรกรส่วนใหญ่อพยพมาจากย่านรังสิต เพื่อหาแหล่งปลูกใหม่ที่น่าจะปลอดภัยจากโรครีกรีนนิ่ง) และแหล่งสุดท้ายคืออำเภอฝาง แม่ฮาย และไชยปราการ ที่กำลังประสบปัญหาในลักษณะเดียวกัน การที่ส้มเป็นโรครีกรีนนิ่งทำให้ใบสังเคราะห์แสงได้น้อยลง การลำเลียงอาหารไปยังส่วนต่างๆ ติดขัดเนื่องจากท่ออาหาร(Phloem) อุดตันจากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของเชื้อสาเหตุโรครีกรีนนิ่ง เป็นเหตุให้อาหารที่ไปเลี้ยงผลไม่เพียงพอ ผลจึงร่วงในที่สุด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าทำลายได้ง่ายและรุนแรงขึ้น เช่น โรครากเน่าโคนเน่า ทำให้ต้นส้มที่เป็นโรครีกรีนนิ่งมีอาการโรครากเน่าโคนเน่ารุนแรงกว่าต้นที่ไม่ติดโรคนั้นนักวิชาการจากทั่วโลกตลอดจนถึงตัวเกษตรกรเองต่างก็พยายามหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้นี้ แต่ยังไม่สามารถแก้ไขได้ผลเป็นที่น่าพอใจ จึงเป็นโอกาสให้บรรดานักวิจัยโอกาสหาวิธีการสร้างความร่ำรวยบนความเดือนร้อนของเกษตรกร เช่น การหลอกขายปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพ ฮอร์โมนป้องกันผลร่วง ฯลฯ เมื่อเกษตรกรหลงเชื่อซื้อผลิตภัณฑ์ (ที่ส่วนมากมีราคาแพงเกินเหตุ) มาใช้ ระยะแรกต้นส้มอาจจะมีอาการดีขึ้นบ้าง หากแต่หลังจากนั้นอาการเดิมๆ จากโรครีกรีนนิ่งก็จะกลับมาปรากฏให้เห็นอีก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้เกี่ยวข้องกับการส้มจะได้ช่วยกันหาวิธีป้องกันกำจัดโรคนี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการบรรเทาความเดือดร้อนของเกษตรกร แม้ว่าจะไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเบ็ดเสร็จ แต่หากสามารถยืดอายุการให้ผลผลิตออกไปได้ หรือชะลอการติดโรครีกรีนนิ่งให้ช้าลงบ้างหรือสามารถประคับประคองให้ส้มทนทานโรคอยู่ได้นานขึ้น ก็น่าจะช่วยให้เกษตรกรสามารถมีชีวิตที่ดีขึ้นได้ อย่างน้อยก็เป็นการสื่อถึงเกษตรกรได้ว่า รัฐไม่ได้ทอดทิ้งให้เกษตรกรดิ้นรนต่อสู้เพียงลำพังแต่อย่างใด



7. วิธีดำเนินการ

- ระยะเวลาที่ดำเนินการ ปีที่เริ่มต้น 2558 ปีที่สิ้นสุด 2563

- วิธีดำเนินงาน/ขั้นตอนการวิจัย

ดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

1. ขยายพันธุ์ส้มลูกผสม แป้น x สายน้ำผึ้ง และ แป้น x เขียวหวาน คู่ผสมละ 1 สายต้น ที่ผ่านการคัดเลือกและเปรียบเทียบพันธุ์ที่ทนทานต่อโรครินนิ่งในแปลงของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน จำนวนสายต้นละ 150 ต้น (เสียบยอดบนต้นตอส้มคลีโอพัตราหรือ Troyer)
2. ขยายพันธุ์ส้มเขียวหวานหรือสายน้ำผึ้งหรือทั้ง 2 พันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกกว่าทนทานต่อโรครินนิ่งพันธุ์ละ 1 สายต้น โดยแบ่งเป็นส้มเขียวหวานสายต้นละ 100 ต้น และส้มสายน้ำผึ้งสายต้นละ 50 ต้น
3. นำต้นพันธุ์ส้มลูกผสม เขียวหวาน และสายน้ำผึ้ง ที่ขยายพันธุ์ไว้และพร้อมปลูกลงในแปลงเกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้
 - แปลงที่ 1 แปลงเกษตรกรจังหวัดน่าน ปลูกลูกผสม แป้น x เขียวหวานแป้น x สายน้ำผึ้ง และส้มเขียวหวาน อย่างละ 50 ต้น
 - แปลงที่ 2 แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ ปลูกลูกผสม แป้น x เขียวหวานแป้น x สายน้ำผึ้ง และส้มสายน้ำผึ้ง อย่างละ 50 ต้น
 - แปลงที่ 3 แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงราย ปลูกลูกผสม แป้น x เขียวหวานแป้น x สายน้ำผึ้ง และส้มเขียวหวาน อย่างละ 50 ต้น

- การบันทึกข้อมูล

1. คุณสมบัติทางเคมีของดิน และธาตุอาหารในดิน ก่อนเข้าดำเนินการ
2. ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา ได้แก่ ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์
3. ลักษณะการเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูงต้น (ตั้งแต่ระดับพื้นดิน - ปลายยอด) เส้นรอบวงลำต้น (บนรอยต่อ 5 ซม. และล่างรอยต่อ 5 ซม.) ความกว้างทรงพุ่ม (ทุก 3 เดือน)
4. การเข้าทำลายของโรค/แมลงศัตรูส้ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาการที่สัมพันธ์กับโรครินนิ่ง

-แบบและวิธีการทดลอง : ไม่มีการวางแผนการทดลอง

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ปี 2563 ข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นส้มลูกผสม อายุ 4 ปี พบว่าในแปลงเกษตรกรจังหวัดน่าน ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีความสูง 281 ซม.เขียวหวานมีความสูง 272 ซม. ลูกผสมแป้นเขียวหวานมีความสูง 236 ซม.ขนาดของทรงพุ่ม ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีขนาด 272 ซม.เขียวหวานมีขนาด 244 ซม. ลูกผสมแป้นเขียวหวานมีขนาด 231 ซม.ขนาดรอบลำต้น พบว่าเขียวหวานมีขนาด 21 ซม. ลูกผสมแป้นสายน้ำผึ้งมีขนาด 20 ซม.ลูกผสมแป้นเขียวหวานมีขนาด 19 ซม. เจริญเติบโตของต้นส้มลูกผสม อายุ 4 ปี พบว่าในแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีความสูง 228 ซม. ลูกผสมแป้นเขียวหวานมีความสูง 224 ซม.สายน้ำผึ้งมีความสูง 207 ซม.ขนาดของทรงพุ่ม ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีขนาด 192 ซม.ลูกผสมแป้นเขียวหวานมีขนาด 180 ซม.สายน้ำผึ้งมีขนาด 172 ซม.ขนาดรอบลำต้น พบว่า ลูกผสมแป้นสายน้ำผึ้งมีขนาด 30.92 ซม.ลูกผสมแป้นเขียวหวานมีขนาด 30.12 ซม. สายน้ำผึ้งมีขนาด 17.42 ซม. แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงรายลูกผสมแป้นx เขียวหวานความสูง 215 ซม.เขียวหวานมีความสูง 172 ซม. ลูกผสมแป้นxสายน้ำผึ้งมีความสูง 172 ซม.ขนาดของทรงพุ่ม ลูกผสมแป้นx เขียวหวานมีขนาด 138 ซม.เขียวหวานมีขนาด 128 ซม. ลูกผสมแป้นxสายน้ำผึ้งมีขนาด 97 ซม.ขนาดรอบลำต้น พบว่าลูกผสมแป้นxเขียวหวานมีขนาด 22.23 ซม. เขียวหวานมีขนาด 12.77 ซม.ลูกผสมแป้นxสายน้ำผึ้งมีขนาด 12.23 ซม.

การประเมินลักษณะอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิ่งของต้นส้มลูกผสม พบว่า ส้มลูกผสมแป้นxสายน้ำผึ้งและมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏอาการ ส้มลูกผสมแป้นxเขียวหวานมีระดับความรุนแรงโรคอยู่ในระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง < 25% ส้มสายน้ำผึ้งและส้มเขียวหวานมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 1 (ตารางที่ 1)

สำหรับคุณภาพของผลผลิตของต้นส้มลูกผสม อายุ 4 ปี พบว่าในแปลงเกษตรกรจังหวัดน่านลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 38.4 กก. น้ำหนักต่อผล 87.3 กรัม ขนาดผล 58.7 มม.จำนวนกลีบ 11.4 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 19.9 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.2 มม. ความหวาน 11.4 บริกซ์ (%) ลูกผสมแป้นx เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 30.4 กก. น้ำหนักต่อผล 108.1 กรัมขนาดผล 63.2 มม. จำนวนกลีบ 10.7 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 17.6 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.7 มม. ความหวาน 12.5 บริกซ์ (%) เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 32.0 กก. น้ำหนักต่อผล 108.5 กรัมขนาดผล 59.6 มม. จำนวนกลีบ 10.7 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 11.7 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.7 มม. ความหวาน 11.1 บริกซ์ (%)

ในแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 42.5 กก. น้ำหนักต่อผล 95.5 กรัม ขนาดผล 65.7 มม.จำนวนกลีบ 13.2 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 14.5 เมล็ดความหนาเปลือก 1.2 มม. ความหวาน 13.4 บริกซ์ (%) ลูกผสมแป้นx เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 35.4 กก. น้ำหนักต่อผล 110.1 กรัม ขนาดผล 64.2 มม.จำนวนกลีบ 11.7 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 15.0 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.7 มม. ความหวาน 13.7 บริกซ์ (%) เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 35.5 กก.

น้ำหนักต่อผล 92.0 กรัม ขนาดผล 59.3 มม.จำนวนกลีบ 10.0 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 12.5 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.3 มม. ความหวาน 14.5 บริกซ์ (%)

แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงรายลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้งมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 23.5 กก.น้ำหนักต่อผล 36.0 กรัม ขนาดผล 40.0 มม.จำนวนกลีบ 9.4 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 14.0 เมล็ด ความหนาเปลือก 1.2 มม. ความหวาน 15.5 บริกซ์ (%) ลูกผสมแป้นx เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 27.5 กก.น้ำหนักต่อผล 80.0 กรัมขนาดผล 54 มม.จำนวนกลีบ 10.5 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 11.5 เมล็ดความหนาเปลือก 1.5 มม. ความหวาน 17.4 บริกซ์ (%) เขียวหวานมีน้ำหนักผลต่อต้นจำนวน 25.4 กก.น้ำหนักต่อผล 50.4 กรัมขนาดผล 43.0 มม.จำนวนกลีบ 10.0 กลีบ จำนวนเมล็ดต่อผล 10.5 เมล็ดความหนาเปลือก 1.7 มม. ความหวาน 17.4 บริกซ์ (%) (ตารางที่ 2)

ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR ครั้งที่ 1 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจำนวนสายพันธุ์ละ 3 ต้นทั้งสามสถานที่จำนวนทั้งสิ้น 27 สายต้น ในวันที่ 23 มิ.ย. 63 คัดเลือกต้นที่ไม่ปรากฏอาการคล้ายโรคกรีนนิ่ง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจพบว่า ทั้ง 27 สายต้นไม่พบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง (ตารางที่ 3)

ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR ครั้งที่ 2 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างใบส้มจำนวนสายพันธุ์ละ 3 ต้นโดยเก็บตัวอย่างจากต้นเดิมทั้งสามสถานที่จำนวนทั้งสิ้น 27 สายต้น ในวันที่ 18 ส.ค. 63 คัดเลือกต้นที่ไม่ปรากฏอาการคล้ายโรคกรีนนิ่ง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจ พบว่า ทั้ง 27 สายต้นพบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่ง จำนวน 1 สายต้นคือลูกผสมแป้นxเขียวหวานต้นที่ 3 (ตารางที่ 4)

จากการส่งผลส้มลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง และ ลูกผสมแป้น X เขียวหวาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Bata-carotene และ Vitamin C ผลการวิเคราะห์ Bata-carotene และ Vitamin C พบว่า ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง มีปริมาณ Bata-carotene 101.42 $\mu\text{g}/100\text{g}$ และ Vitamin C มีปริมาณ 8.78 $\text{mg}/100\text{g}$ ลูกผสมแป้นx เขียวหวาน มีปริมาณ Bata-carotene 108.29 $\mu\text{g}/100\text{g}$ และ Vitamin C มีปริมาณ 9.78 $\text{mg}/100\text{g}$ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเจริญเติบโต เส้นรอบวงของลำต้น ความสูง ขนาดทรงพุ่ม และประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง ปี 2563

ลำดับ	สายต้น	ความสูง (ซม.)	ขนาดทรงพุ่ม (ซม.)	เส้นรอบวง ของลำต้น (ซม.)	ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
1	ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง(นน.)	281	272	28	0
2	ลูกผสมแป้นx เขียวหวาน(นน.)	236	231	26	1
3	เขียวหวาน(นน.)	272	243	25	1
4	ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง(ซม.)	228	192	22	0
5	ลูกผสมแป้นx เขียวหวาน(ซม.)	224	180	22	1
6	สายน้ำผึ้ง(ซม.)	207	172	17	1
7	ลูกผสมแป้นx สายน้ำผึ้ง(ซร.)	172	97	12	0
8	ลูกผสมแป้นx เขียวหวาน(ซร.)	215	138	22	1
9	เขียวหวาน(ซร.)	172	128	12	1

หมายเหตุ

การประเมินการเกิดโรค (ดัดแปลงจากสันติ และสุธามาต, 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 ปี 2563

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนา เปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์ บริกซ์ (%)
น่าน	ลูกผสมแป้นX สายน้ำผึ้ง(นน.)	38.4	87.3	58.7	11.4	19.9	1.2	11.4
	ลูกผสมแป้นX เขียวหวาน(นน.)	30.4	108.1	63.2	10.7	17.6	1.7	12.5
	เขียวหวาน(นน.)	32.0	108.5	59.6	10.7	11.7	1.7	11.1
	ลูกผสมแป้นX สายน้ำผึ้ง(ชม.)	42.5	95.5	65.7	13.2	14.5	1.2	13.4
	ลูกผสมแป้นX เขียวหวาน(ชม.)	35.4	110.1	64.2	11.7	15.0	1.7	13.7
	สายน้ำผึ้ง(ชม.)	35.5	92.0	59.3	10.0	12.5	1.3	14.5
	ลูกผสมแป้นX สายน้ำผึ้ง(ชร.)	23.5	36.0	40.0	9.4	14.0	1.2	15.5
	ลูกผสมแป้นX เขียวหวาน(ชร.)	27.5	80.0	54.0	10.5	11.5	1.5	17.4
	เขียวหวาน(ชร.)	25.4	50.4	43.0	10.0	10.5	1.7	16.0

ตารางที่ 3 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR ครั้งที่ 1

ลำดับ	สายต้น	ผลการตรวจ
1	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
2	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
3	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
4	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
5	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
6	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
7	สายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
8	สายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
9	สายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
10	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
11	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
12	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
13	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
14	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
15	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
16	เขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
17	เขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
18	เขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
19	แป้นxสายน้ำผึ้ง นน.	ผลตรวจ -
20	แป้นxสายน้ำผึ้ง นน.	ผลตรวจ -
21	แป้นxสายน้ำผึ้ง นน.	ผลตรวจ -
22	แป้นxเขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
23	แป้นxเขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
24	แป้นxเขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
25	เขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
26	เขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
27	เขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -

P = positive control (ผลตรวจ : +)

N = negative control (ผลตรวจ : -)

I = citrus psyllid (ผลตรวจ : -)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค Real-time PCR ครั้งที่ 2

ลำดับ	สายต้น	ผลการตรวจ
1	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
2	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
3	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
4	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
5	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
6	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
7	สายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
8	สายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
9	สายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
10	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
11	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
12	แป้นxสายน้ำผึ้ง ชม.	ผลตรวจ -
13	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
14	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
15	แป้นxเขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ +
16	เขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
17	เขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
18	เขียวหวาน ชม.	ผลตรวจ -
19	แป้นxสายน้ำผึ้ง นน.	ผลตรวจ -
20	แป้นxสายน้ำผึ้ง นน.	ผลตรวจ -
21	แป้นxสายน้ำผึ้ง นน.	ผลตรวจ -
22	แป้นxเขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
23	แป้นxเขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
24	แป้นxเขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
25	เขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
26	เขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -
27	เขียวหวาน นน.	ผลตรวจ -

P = positive control (ผลตรวจ : +)

N = negative control (ผลตรวจ : -)

I = citrus psyllid (ผลตรวจ : -)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ Beta-carotene และ Vitamin C

สายต้น	Beta-carotene ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Vitamin C ($\text{mg}/100$)
ลูกผสมแป้นxสายน้ำผึ้ง	101.42	8.76
ลูกผสมแป้นxเขียวหวาน	108.29	9.78

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่ต้านทานหรือทนทานต่อโรครินนิ่ง พบว่า สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มีความทนทานต่อโรครินนิ่งตามเกณฑ์ คือ ได้ต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของโรคหรือปรากฏอาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรครินนิ่ง 0-25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรครินนิ่ง (*Candidatus liberibacter asiaticus*) ได้ 1 สายต้น คือ ลูกผสมแป้น x สายน้ำผึ้งซึ่งสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ทั้งสามพื้นที่ และยังพบว่าปริมาณ Beta-carotene สูง จากการทดสอบยังพบอีกว่าผลของส้มมีการสุกแก่ก่อนส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งประมาณ 1 เดือน รสชาติของน้ำคั้นมีรสที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคคือมีรสเปรี้ยวนำหวานและมีกลิ่นหอมของส้มสายน้ำผึ้งอยู่ด้วย

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เกษตรกรผู้ปลูกส้ม นักวิชาการเกษตร หรือผู้สนใจสามารถนำผลการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่คัดเลือกได้ไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการป้องกันและกำจัดโรครินนิ่งได้

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่ร่วมปฏิบัติงานและเก็บข้อมูลในการทดสอบนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรที่ให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบโรครินนิ่งในห้องปฏิบัติการ จนการทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

ดารุณี ปุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันตวานิช และ ณีฐิมา โฆษิตเจริญกุล. การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter species* สาเหตุโรคฮวงหลงบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR Detection *Candidatus Liberibacter species* cause of Huanglongbing (Greening) disease by Real-time PCR. รายงานผลงานวิจัยประจำ ปี ๒๕๕๕ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 2460-2463.

สันติ โยธราชภูร์ และ สุธามาศ ณ น่าน. มะละกอที่พุ่ม. โรคกรีนนิ่งในส้มโออำเภอเวียงแก่น.

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1 ส้มลูกผสมแป้นXเขียวหวาน



ภาพผนวกที่ 2 ส้มลูกผสมแป้นXสายน้ำผึ้ง



ภาพผนวกที่ 3 ลักษณะผลส้มลูกผสมแป้นXเขียวหวาน



ภาพผนวกที่ 4 ลักษณะผลส้มลูกผสมแป้นXสายน้ำผึ้ง



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะสีของน้ำคั้นส้มลูกผสมแป้นXสายน้ำผึ้ง



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะสีของน้ำคั้นส้มลูกผสมแป้นXเขียวหวาน



1. การตรวจโรคกรีนนิงโดยใช้เทคนิค 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 ที่เกิดขึ้น โดยไม่ต้องนำไปผ่านเทคนิค gel electrophoresis

2. การตรวจโรคกรีนนิงโดยใช้เทคนิค 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% Na₂SO₃ หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน ย้ายใส่หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดของเหลวใส ส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส ชั้นบนใสในหลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanol (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนมาล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น นิ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง ขั้นตอนต่อไป

วิธีการตรวจสอบการเชื้อโรคกรีนนิงด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Jagoueix et. al. (1996) ด้วยคู่ไพรเมอร์ OI1 และ OI2c ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 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

- น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O)	7.0	ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ forward (OI1) (10 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
- ไพรมเมอร์ reverse (OI2c) (10 pmol)	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



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

M = 1kb DNA Ladder (fermentas®)

1 – 40 คือ ตัวอย่างส้มจากแปลงทดสอบพันธุ์

P = Positive control

ผลการตรวจสอบ

พบว่าตัวอย่างที่เลือกเก็บมาตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรีย '*Ca. L. asiaticus*' สาเหตุของโรคกรีนนิงด้วยเทคนิค PCR ทั้งหมด 40 ตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย '*Ca. L. asiaticus*' ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเป็นโรคกรีนนิง จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างหมายเลข 24 (แป้นเขียวหวาน ชร.), 34 (PxOC#4) และ 37 (PxOC#15) ซึ่งจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 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

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาจากสถานีตรวจอากาศจังหวัดน่าน 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