รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาส้มเปลือกล่อนในเขตภาคเหนือระยะที่ 2

Research and Development on Loose Skin Citrus in the North Phase 2

ทวีพงษ์ ณ น่าน

Taweepong N Nan

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาส้มเปลือกล่อนในเขตภาคเหนือระยะที่ 2

Research and Development on Loose Skin Citrus in the North Phase 2

ทวีพงษ์ ณ น่าน

Taweepong N Nan

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2563

คำปรารภ

โครงการวิจัยและพัฒนาส้มเปลือกล่อนในเขตภาคเหนือระยะที่ 2 ดำเนินการต่อจากโครงการวิจัยปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ส้มเปลือกล่อนที่สิ้นสุดลงใน ปี 2558 มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการลดความเสียหายของส้มอันเนื่องมาจากโรคกรีนนิ่ง ปรับปรุงพันธุ์ส้มให้มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง และผลผลิตมีคุณภาพดี ตรงตามความต้องการของตลาด สามารถถ่ายทอดและเผยแพร่ความรู้ให้แก่กลุ่มเกษตรกร เกี่ยวกับการจัดการแบบผสมผสานเพื่อลดความเสียหายของส้มจากโรคกรีนนิ่งได้

โครงการนี้ประกอบด้วย 2 กิจกรรม คือ 1) การปรับปรุงพันธุ์ส้มทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง และ 2) การศึกษาวิธีการลดความเสียหายของส้มเขียวหวานและสายน้ำผึ้งจากโรคกรีนนิ่ง ซึ่งแยกย่อยออกเป็นการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้น จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ในใบ การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมชุดที่สอง ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นทางเคมีในแปลงทดลอง จำนวน 119 สายต้น การทดลองส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงปลูกของเกษตรกร ในแหล่งปลูกส้มจังหวัดน่านจังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดเชียงราย ตลอดจนการศึกษาอิทธิพลของต้นตอส้มทนโรคกรีนนิ่งพันธุ์ต่างๆ ที่มีต่อยอดพันธุ์ดี เพื่อหาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการลดความรุนแรงของโรคกรีนนิ่งในส้มเปลือกล่อน จากนั้นจึงจะเป็นขั้นตอนการจัดเสวนาหรือฝึกอบรมวิชาการ เพื่อแลกเปลี่ยนเรียนรู้ประสบการณ์และถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกร
ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทนำ	4
บทคัดย่อ	5
กิจกรรมที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์ส้มทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง	7
กิจกรรมที่ 2 การศึกษาวิธีการลดความเสียหายของส้มเขียวหวานและสายน้ำผึ้งจากโรคกรีนนิ่ง	11
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	35
บรรณานุกรม	36
ภาคผนวก	37

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่องจากโครงการวิจัยปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ส้มเปลือกล่อนในปี 2558 ขอขอบคุณนายพันธ์ศักดิ์ แก่นหอม ข้าราชการบำนาญ กรมวิชาการเกษตรที่ให้ข้อมูล ความรู้ และคำแนะนำเพิ่มเติมในการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 และเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชที่ตรวจตัวอย่างส้มในห้องปฏิบัติการและให้คำแนะนำในการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง นอกจากนี้ขอขอบคุณเกษตรกรและเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ที่ช่วยกันปฏิบัติงานด้วยความมุ่งมั่นและตั้งใจ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

พันธ์ศักดิ์ แก่นหอม
Pansak Khanhom
สุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง
Sutthini Likittrakulrung
วีระ วรปิติรังสี
Veera Vorapitirangsri
แสนชัย คำหล้า
Sanchai Komla
เกียรติรวี พันธ์ไชยศรี
Kietravee Phanchaisri

ทวีพงษ์ ณ น่าน
Taweepong N Nan
วิทยา อภัย
Witaya Apai
กรกช จันทร
Korakot Janton
ศศิธร วรปิติรังสี
Sasitron Vorapitirangsi

นริศรา สุวรรณ
Narisra Suwan
ชัยกฤต พรมมา
Chaiyakit Promma
ปฏิพัทธ์ ใจปิน
Patipat Jaipin
สันติ โยธาราษฎร์
Santi Yotharath

กรมวิชาการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PCR	=	Polymerase Chain Reaction
Real-time PCR	=	Real-time Polymerase Chain Reaction
CT	=	Concentrate
ExP	=	ส้มลูกผสมเขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น
ExSP	=	ส้มลูกผสมเขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มสายน้ำผึ้ง
GWxKW	=	ส้มลูกผสม Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน
SPxGW	=	ส้มลูกผสมสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash
GWxSP	=	ส้มลูกผสม Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง
(PxKW)xP	=	ส้มลูกผสม (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน) x ส้มแป้น
PxO	=	ส้มลูกผสมส้มแป้น x ส้ม Ocean
PxSP	=	ส้มลูกผสมส้มแป้น x สายน้ำผึ้ง
PxKW	=	ส้มลูกผสมส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน
SP	=	ส้มสายน้ำผึ้ง
KW	=	ส้มเขียวหวาน
µg/100g	=	Microgram per 100 gram

คำสำคัญ (Keywords)

ส้มลูกผสม การคัดเลือก โรคกรีนนิ่ง เทคนิค PCR

Hybrid Orange, Selection, Greening disease, Polymerase Chain Reaction

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

พื้นที่ปลูกส้มเขียวหวานในเขตภาคเหนือของประเทศไทยได้ลดลงอย่างมาก โดยที่จังหวัดเชียงใหม่ลดลงจาก 93,047 ไร่ ในปี 2551 เหลือเพียง 34,839 ไร่ ในปี 2554 จังหวัดแพร่ลดจาก 40,000 ไร่ เหลือไม่เกิน 10,000 ไร่ ในขณะที่จังหวัดน่านลดลงจาก 20,000 ไร่ (ปี 2541) เหลือ 1,900 ไร่ในปัจจุบัน สำหรับจังหวัดอื่นๆ ก็มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ปัญหาสำคัญของการปลูกส้มเปลือกล่อน คือ การที่ต้นส้มทรุดโทรมและตายเนื่องจากการเป็นโรคกรีนนิ่ง ทำให้ผลผลิตร่วงหล่นก่อนการเก็บเกี่ยว มีผลให้เกษตรกรได้รับผลตอบแทนไม่คุ้มค่ากับการลงทุน ซึ่งแหล่งปลูกส้มที่สำคัญของไทยทั้งในอดีตและปัจจุบันก็ประสบกับปัญหานี้เช่นกัน เช่น แหล่งปลูกส้มบริเวณทุ่งหลวงรังสิต กำแพงเพชร แพร่ น่าน รวมทั้งแหล่งผลิตส้มผืนใหญ่ของไทยในปัจจุบัน คือ ที่ อ.ฝาง แม่อาย และไชยปราการ โรคกรีนนิ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (*Candidatus liberibacter* asiaticus) ที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของต้นส้ม โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorina citri* Kuw. (Martinez and Wallace, 1967) และ *Triozaerytreae* (McClean and Oberholzer, 1965) เป็นแมลงพาหะนำเชื้อเข้าสู่ต้นส้มที่ปลูกแถบเอเชียและแอฟริกา ตามลำดับ ต้นส้มที่เป็นโรคจะมีอาการใบเหลือง ต้นโทรมเนื่องจากเชื้อโรคกรีนนิ่งเข้าไปอุดตันท่ออาหาร ทำให้การลำเลียงอาหารไปเลี้ยงราก ผล และใบอ่อนได้ไม่เพียงพอ ใบแสดงอาการขาดธาตุอาหาร อาการแรกเริ่มคือใบมีจุดประสีเหลือง เส้นใบยังคงมีสีเขียว ถ้าอาการรุนแรงใบอ่อนจะมีสีเขียวซีด เส้นใบมีสีเหลือง และบวม (Nakashima *et.al.*, 1998) ต้นที่กำลังให้ผลผลิตผลส้มจะชะงักการเจริญเติบโตและร่วง

ปัญหาดังกล่าวจะต้องดำเนินการแก้ไขอย่างเร่งด่วน ซึ่งแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหา คือ การปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ให้มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง ผลผลิตมีคุณภาพดี ตรงตามความต้องการของตลาด ลดความเสียหายของส้มอันเนื่องมาจากโรคกรีนนิ่ง ช่วยให้เกษตรกรสามารถมีชีวิตที่ดีขึ้นได้

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาส้มเปลือกล่อนในเขตภาคเหนือระยะที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ส้มเปลือกล่อนให้ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง ดำเนินการที่แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน และแปลงเกษตรกรใน จังหวัดน่าน, จังหวัดเชียงใหม่ และ จังหวัดเชียงราย ระหว่างปี 2558-2563 มี 3 การทดลอง ได้แก่ 1) การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ 2) การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ทนทานหรือต้านทานโรคกรีนนิ่งในแปลง 3) การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร โดยดำเนินการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ทนทานหรือต้านทานโรคกรีนนิ่ง มีเกณฑ์การคัดเลือก คือ ต้นส้มมีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0-25 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) แล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatus liberibacter asiaticus*) ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ (2558-2559) จำนวน 119 สายต้น ในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 พบว่า ได้ต้นส้มลูกผสมที่มี Peroxidase activity มากกว่าส้มสายน้ำผึ้ง (ชุดควบคุมลบ) จำนวน 71 ต้น การทดลองนี้เป็นการคัดเลือกส้มลูกผสมเบื้องต้นที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งนำไปสู่การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง ซึ่งจะดำเนินการในปี 2559–2563

การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ทนทานหรือต้านทานโรคกรีนนิ่งในแปลง พบว่า ต้นส้มส่วนใหญ่มีความแข็งแรงปกติ และมีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 0 คือ ไม่ปรากฏอาการ แต่มีสายต้นที่เริ่มปรากฏอาการระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่งน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ พบทั้งหมด 18 สายต้น สายต้นที่แสดงอาการระดับ 2 คือ คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50 เปอร์เซ็นต์ พบทั้งหมด 3 สายต้น จากนั้นได้ส่งตัวอย่างใบส้มลูกผสมทั้งหมด เพื่อตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกรีนนิ่งด้วยเทคนิค Real-time PCR จำนวน 96 ตัวอย่าง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจสอบ ได้คัดเลือกต้นส้มลูกผสมในกลุ่ม A ที่เป็นโรคกรีนนิ่งน้อย และกลุ่ม N ที่ไม่พบ โรคกรีนนิ่ง ที่สามารถให้ผลผลิตส้มลูกผสมโดยมีน้ำหนักผลต่อต้นไม่น้อยกว่า 2.5 กิโลกรัมต่อต้นขึ้นไปและมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ไม่น้อยกว่า 8 องศาบริกซ์ 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

การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร ปลูกทดสอบในแปลงเกษตรกร จังหวัดน่าน จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดเชียงราย สายต้นละ 50 ต้นต่อแปลง ไม่มีแผนการทดลอง ผลการทดลองแปลงเกษตรกรทั้ง 3 จังหวัด พบว่า PXSP ไม่ปรากฏอาการของโรคกรีนนิ่ง, PXKW มีระดับความรุนแรงโรคอยู่ในระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง < 25% SP และ KW มีระดับความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 1 ส่วนการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกรทั้งหมด ด้วยเทคนิค PCR จำนวน 27 สายต้น โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจ พบว่า มี PxKW (ชร.) เป็นโรคกรีนนิ่งเพียงต้นเดียว ได้ต้นส้มลูกผสมที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์จำนวน 1 สายต้น คือ PxSP สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ทั้งสามพื้นที่ และยังพบว่ามีปริมาณ Bata-carotene 101.42 µg/100g และ Vitamin C มีปริมาณ 8.78 mg/100g

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

The research and development on loose skin citrus in the north phase 2 project were improved of loose skin citrus varieties to greening disease. This project was conducted at Nan Agricultural Research and Development center and farmer field at Nan province, Chaingmai province and Chaingrai province during 2015-2020.It was composed with 3 experiments, such as primary selection of hybrid orange via analysis method by Peroxidase activity, the selection of hybrid orange varieties to greening disease in the farm and testing of resistance hybrid orange, tangerine and Sainamphung to greening disease in the farmer field at . The selection criteria of the experiment were tolerant to greening disease and invisible pathogen (*Candidatus liberibacter asiaticus*) by Polymerase Chain Reaction (PCR) the result showed that,

Primary Selection of hybrid orange via analysis method by Peroxidase activity in leaf total (during 2015-2016) 119 clone in laboratory of OARD1. We found that hybrids orange those had higher Peroxidase activity than (Sainamphung) control set were 71 clone .This experiment could select hybrid orange those resistance to greening disease in laboratory level to the selection of hybrid orange varieties to greening disease in the farm.

Orange selection for greening resistance at farm level. Most of plant were healthy and go score of severe disease were level 0 (no symptom appear) but there were 18 clones those showed symptom level 1 as small, yellow leaf, erecting top leaf and unhealhty plant due to greening disease less than 25% , and there were 3 clones those showed symptom level 2 as small, yellow leaf, erecting top leaf and unhealhty plant due to greening disease less than 25-50%. 96 samples leaf were sent to detect bacterial caused of greening disease by Real-time PCR at office of Plant Protection Research and Development. The selection result could divided those hybrid orange to 2 groups. Group A less greening disease those provided minimum yield 2.5 kilogram/plant with 8% Brix sweetness. As this criteria select 11 clone of hybrid orange 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.

Hybrid orange tangerine and Sainampuaeng for tolerant testing to greening disease on farmer field at Nan province, Chaingmai province and Chaingrai province 50 plants/clones were planted. This experiment was non experimental design. The result were found that PxSP invisible greening disease symptom. PxKW, SP and showed level 1 as small, yellow leaf, erecting top leaf and unhealhty plant due to greening disease less than 25%. 27 clones were checked to greening disease by PCR. Result of detection found that only PxKW (Chaingrai) showed greening disease symptom. PxSP could adapted the 3 different environment and provide Beta-carotene 101.42 ug/100 g with vitamin C 8.78 mg/100 g.

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์ส้มทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง

การทดลองที่ 1.1 การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ (ปี 2558-2559)

ดำเนินการทดลองโดยใช้ต้นกล้าลูกผสมคู่ต่าง ๆ ที่มีต้นพ่อหรือแม่ หรือทั้งต้นพ่อและแม่มีประวัติทนทาน/ต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง ซึ่งเป็นลูกผสมชุดที่ 2 (แผนผังการปรับปรุงพันธุ์ส้มให้ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง) ทำการสกัดโปรตีนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase จากใบที่ 3 – 5 นับจากยอดของต้นกล้าลูกผสมทุกต้น และจากใบของส้มแป้นซึ่งต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งในระดับสูง (Resistance) รวมถึงจากใบของส้มสายน้ำผึ้งซึ่งอ่อนแอต่อโรคกรีนนิ่ง (Susceptible) การสกัดโปรตีนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ใช้กรรมวิธีของ Lowry *et al*. (1951) และดัดแปลงโดย Legget-Bailey (1962) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ peroxidase assay โดยวิธีของ Van Lelyveid *et al*. (1975) ซึ่งจะได้ค่าของ Peroxidase activity unit greening ของส้มลูกผสมต่างๆ เทียบกับของส้มแป้นและส้มสายน้ำผึ้ง (ชุดควบคุม)

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
2. ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร

อุปกรณ์

1. เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

1.1 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

2.2 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2

2.3 สีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250

2. สารเคมีที่ใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

1. สารละลายสับสเตรต

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการ

1. การสกัดโปรตีน

การสกัดโปรตีนและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากใบส้ม ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) โดยชั่งใบส้มที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นจัดแล้วเติมสารละลายสำหรับสกัด (extraction solution) คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นบดใบส้มให้ผสมเข้ากับสารละลายที่ใช้สกัดในโกร่งบดที่แช่ในอ่างน้ำแข็งจนเข้ากันดีประมาณ 1 นาที ปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายสำหรับสกัดแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding ใช้วิธีของ Bradford (1976) วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.1 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 50,100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดทดลอง โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียม-คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน

2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในตัวอย่างใบส้มในระหว่างเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) และวิธีของ Lee and Smith (1979) นำใบส้มไปสกัดเอนไซม์และวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาจำนวน 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสับสเตรต คือ สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่มีกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1% จำนวน 2.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรทันทีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่าง

กรมวิชาการเกษตร

ระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีนต่อนาที ตามสูตร ดังนี้

คำนวณหา Specific activity ของเอนไซมเพอรออกซิเดส ดังนี้

$$\text{Specific activity ของเอนไซม} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซมเพอรออกซิเดส}}{\text{ปริมาณของโปรตีนในหนวยมิลลิกรัม}}$$

การทดลองที่ 1.2 การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง

1. อุปกรณ์

1.1 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

1.2 ปุ๋ยเคมี ได้แก่ ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15, 13-13-21, 46-0-0, 18-46-0 และ 0-0-60

1.3 สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ได้แก่ อะบาแมกติน, ไซเปอร์เมทริน

1.4 วัสดุการเกษตร ได้แก่ จอบ ถุง กระสอบ เวอร์เนีย ไม้บรรทัด ตลับเมตร เครื่องวัดความหวาน (Brix Refractometer)

2. วิธีการ

2.1 ปลูกต้นกล้าส้มลูกผสมคู่ต่างๆ ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ Peroxidase activity (การทดลองที่ 1.1) จำนวน 119 สายต้น ในแปลงทดสอบ ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ระยะปลูกระหว่างต้น 3 เมตร ระหว่างแถว 5 เมตร

2.2 คัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือก คือ ต้นส้มมีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลืองยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0.-25 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบในห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชด้วยเทคนิค Real-time PCR (Real-time Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค PCR (*Polymerase Chain Reaction)* แล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatus liberibacter asiaticus*) บันทึกข้อมูลอาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อโรคกรีนนิ่ง ทุก 3 เดือน และส่งวิเคราะห์ตัวอย่างใบส้มที่สงสัยว่าจะติดเชื้อกรีนนิ่งทุก 6 เดือน ที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.3 การบันทึกข้อมูล

1. การปฏิบัติงานภายในแปลง : การปลูก การดูแลรักษา การกำจัดวัชพืช และการเก็บเกี่ยว
2. ข้อมูลทางด้านเกษตร : การเจริญเติบโต ผลผลิต ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
3. องค์ประกอบผลผลิต : ผลผลิตต่อต้น ขนาดผล จำนวนกลีบต่อผล น้ำหนักผล ความหวาน (%Brix)
4. ข้อมูลทางด้านสังคม : ความพึงพอใจของผู้บริโภค
5. ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา
6. ข้อมูลอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิ่ง ได้แก่ dieback, small leaves และ dwarf ทุก 3 เดือน

กรมวิชาการเกษตร

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน อำเภอเมืองน่าน จังหวัดน่าน

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2563

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร

1. อุปกรณ์

1.1 ส้มลูกผสมทั้งหมด จำนวน 450 สายต้น ได้แก่ PxSP จำนวน 150 สายต้น, PxKW จำนวน 150 สายต้น KW จำนวน 100 สายต้น และ SP จำนวน 50 สายต้น

1.2 ปุ๋ยเคมี ได้แก่ ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15, 13-13-21, 46-0-0, 18-46-0 และ 0-0-60

1.3 สารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช ได้แก่ อะบาแมกติน, ไซเปอร์เมทริน

1.4 วัสดุการเกษตร ได้แก่ จอบ ถุง กระสอบ เวอร์เนีย ไม้บรรทัด ตลับเมตร เครื่องวัดความหวาน (Brix Refractometer)

2. วิธีการ

ปลูกต้นส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกรอำเภอเมือง จังหวัดน่าน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ และอำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย โดยใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 3 เมตร ระหว่างแถว 5 เมตร ปฏิบัติดูแลรักษาแปลงจำนวน 3 แปลง ตามระบบ GAP ส้มเปลือกล่อน รายละเอียด ดังนี้

- แปลงที่ 1 แปลงเกษตรกรอำเภอเมือง จังหวัดน่าน ปลูกส้มลูกผสม แป้น x สายน้ำผึ้ง, แป้น x เขียวหวาน และ ส้มเขียวหวาน อย่างละ 50 ต้น โดยใช้ระยะปลูก 3x6 เมตร พื้นที่ 2 ไร่ จำนวน 1 แปลง

- แปลงที่ 2 แปลงเกษตรกรอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ปลูกลูกผสม แป้น x สายน้ำผึ้ง, แป้น x เขียวหวาน และ ส้มสายน้ำผึ้ง อย่างละ 50 ต้น โดยใช้ระยะปลูก 4x4 เมตร พื้นที่ 2 ไร่ จำนวน 1 แปลง

- แปลงที่ 3 แปลงเกษตรกร อำเภอเวียงชัย จังหวัดเชียงราย ปลูกลูกผสม แป้น x สายน้ำผึ้ง, แป้น x เขียวหวาน และ ส้มเขียวหวาน อย่างละ 50 ต้น พื้นที่ 2 ไร่ จำนวน 1 แปลง

เกณฑ์การคัดเลือกสายต้นที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง

1. ต้นส้มมีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง อาการใบมีขนาดเล็กสีเหลืองยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0.-25 เปอร์เซ็นต์

2. ตรวจสอบในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatus liberibacter asiaticus*)

การบันทึกข้อมูล

1. การปฏิบัติงานภายในแปลง : การปลูก การดูแลรักษา การกำจัดวัชพืช และการเก็บเกี่ยว
2. ข้อมูลทางด้านเกษตร : การเจริญเติบโต ผลผลิต ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
3. องค์ประกอบผลผลิต : ผลผลิตต่อต้น ขนาดผล จำนวนกลีบต่อผล น้ำหนักผล ความหวาน (%Brix)
4. ข้อมูลทางด้านสังคม : ความพึงพอใจของผู้บริโภค
5. ข้อมูลอุตุนิยมวิทยา

กรมวิชาการเกษตร

6. ข้อมูลอาการที่สัมพันธ์กับโรคกรีนนิ่ง ได้แก่ dieback, small leaves และ dwarf ทุก 3 เดือน

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน อำเภอเมืองน่าน จังหวัดน่าน

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2563

กิจกรรมที่ 2 การศึกษาวิธีการลดความเสียหายของส้มเขียวหวานและสายน้ำผึ้งจากโรคกรีนนิ่ง

การทดลองที่ 2.1 อิทธิพลของต้นตอส้มพันธุ์ต่างๆที่ส่งผลให้เกิดความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในยอดพันธุ์ส้มเขียวหวานและสายน้ำผึ้ง (ยุติการทดลองในปี 2558)

แบบและวิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 4 ต้น

กรรมวิธี 1 ต้นตอ ส้มแป้น

กรรมวิธี 2 ต้นตอ ส้มAvon Ever Bearing

กรรมวิธี 3 ต้นตอ ส้มเขียวหวานน่าน เบอร์1(อีหลึก)

กรรมวิธี 4 ต้นตอ ส้ม Rough lemon

กรรมวิธี 5 ต้นตอ ส้มพันธุ์ Troyer (พันธุ์เปรียบเทียบ)

วิธีดำเนินการ

โดยใช้ต้นตอปลอดโรคจากการเพาะเมล็ดอายุ 6 เดือน เปลี่ยนยอดโดยวิธีการติดตา จากยอดพันธุ์ส้มปลอดโรค(การทดลองจังหวัดน่าน ใช้ยอดพันธุ์ส้มเขียวหวานในการทดลองจังหวัดเชียงใหม่ใช้ยอดพันธุ์ส้มสายน้ำผึ้ง)

การบันทึกข้อมูล

1. การเจริญเติบโต (ทุก 6 เดือน) ได้แก่

- ความสูงต้นจากโคนต้น เรือนยอด
- ขนาดทรงพุ่ม (เหนือ-ใต้/ออก-ตก)
- ขนาดเส้นรอบวงลำต้นบริเวณเหนือและใต้รอยต่อระหว่างต้นตอกับยอดพันธุ์ดี 5 เซนติเมตร

2. ความเข้ากันได้ (compatibility) ของต้นตอกับยอดพันธุ์ดี ได้แก่ อัตราส่วนของขนาด เส้นรอบวงของลำต้นต้นตอ และของยอดพันธุ์ดี/การเกิดลักษณะเท้าช้าง(rootstock overgrowth)หรือลักษณะเส้นรอบวงของลำต้นยอดพันธุ์ดีโตกว่าต้นตอ (scion over growth) หรือลักษณะต้นตอมีรอยแตก

3. ระดับความทนทานต่อโรครากและโคนเน่า (ทุก 6 เดือน)

4. ระดับความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งของยอดพันธุ์ส้มเขียวหวานและสายน้ำผึ้ง ทุก 3 เดือน แบ่งเป็น

- Intensity of symptoms โดยนับจำนวนต้นที่มีอาการบ่งชี้ของโรคกรีนนิ่งที่ระดับความรุนแรงต่างๆ (+/++/+++)

- Tree vigor โดยนับจำนวนต้นที่มีอาการต่างกัน 3 ลักษณะ ได้แก่ ++ (vigorous)/+(intermediate)/-(decline) พร้อมระบุอาการที่ปรากฏ เช่นยอดแห้ง (dieback) ใบมีขนาดเล็กและชี้ตั้ง(SL) ต้นแคระแกร็น (dwarf)

- การดูแลรักษา ตามระบบ GAP ส้มเปลือกล่อน

กรมวิชาการเกษตร

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน (ส้มเขียวหวาน)
2. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ (ส้มสายน้ำผึ้ง)

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

แปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน อำเภอเมืองน่าน จังหวัดน่าน และแปลงทดสอบศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2563

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1.1 การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ (ปี 2558-2559)

จากการส่งตัวอย่างใบของต้นส้มลูกผสมที่ได้ผสมตั้งแต่ปี 2556/2557 เพื่อวิเคราะห์ Peroxidase activity ในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จำนวน 119 สายต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 43 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 9 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวา) x แป้น จำนวน 37 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 23 ต้น ผลการวิเคราะห์ พบว่า สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มี Peroxidase activity มากกว่าชุดควบคุมลบ คือ ส้มสายน้ำผึ้งซึ่งมีปริมาณ Peroxidase activity 17.03x10^3Unit/mg protein ได้จำนวน 71 ต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 33 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 5 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 23 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 3 ต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบส้มลูกผสมจำนวน 119 สายต้น

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
Crt+	ส้มแป้น	42.31
Crt-	ส้มสายน้ำผึ้ง	17.03
1	ExP#1	31.62
2	ExP#2	55.74
3	ExP#3	55.92
4	ExP#4	60.48
5	ExP#5	55.70
6	ExP#6	38.66
7	ExP#7	37.15
8	ExP#8	57.18
9	ExP#9	3.67
10	ExP#10	14.29
11	ExP#11	30.78

กรมวิชาการเกษตร

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
Crt+	ส้มแป้น	42.31
Crt-	ส้มสายน้ำผึ้ง	17.03
12	ExP#12	54.32
13	ExP#13	45.78
14	ExP#14	10.81
15	ExP#15	72.05
16	ExP#16	12.69
17	ExP#17	14.62
18	ExP#18	32.15
19	ExP#19	54.52
20	ExP#20	49.78
21	ExP#21	36.81
22	ExP#22	71.4
23	ExP#23	52.52
24	ExP#24	33.47
25	ExP#25	9.73
26	ExP#26	61.97
27	ExP#27	10.53
28	ExP#28	91.06
29	ExP#29	12.85
30	ExP#30	39.11
31	ExP#31	63.27
32	ExP#32	57.87
33	ExP#33	65.21
34	ExP#34	47.04
35	ExP#35	81.18
36	ExP#36	68.85
37	ExP#37	72.21
38	ExP#38	17.69

กรมวิชาการเกษตร

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
Crt+	ส้มแป้น	42.31
Crt-	ส้มสายน้ำผึ้ง	17.03
39	ExP#39	63.77
40	ExP#40	76.25
41	ExP#41	65.88
42	ExP#42	14.18
43	ExP#43	12
44	ExSP#1	17.29
45	ExSP#2	24.75
46	ExSP#3	13.19
47	ExSP#4	18.42
48	ExSP#5	26.82
49	ExSP#6	22.52
50	ExSP#7	14.88
51	ExSP#8	12.81
52	ExSP#9	14.07
53	GWxKW#1	17.86
54	GWxKW#2	26.21
55	GWxKW#3	21.35
56	SPxGW	21.26
57	GWxSP#1	24.97
58	GWxSP#2	18.12
59	GWxSP#3	22.92
60	(PxKW)xP#1	25.22
61	(PxKW)xP#2	40.37
62	(PxKW)xP#3	26.73
63	(PxKW)xP#4	20.64
64	(PxKW)xP#5	29.6
65	(PxKW)xP#6	19.37
66	(PxKW)xP#7	22.49

กรมวิชาการเกษตร

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
Crt+	ส้มแป้น	42.31
Crt-	ส้มสายน้ำผึ้ง	17.03
67	(PxKW)xP#8	10.88
68	(PxKW)xP#9	19.44
69	(PxKW)xP#10	17.38
70	(PxKW)xP#11	26.58
71	(PxKW)xP#12	15.09
72	(PxKW)xP#13	19.02
73	(PxKW)xP#14	19.07
74	(PxKW)xP#15	63.93
75	(PxKW)xP#16	12.23
76	(PxKW)xP#17	18.24
77	(PxKW)xP#18	15.34
78	(PxKW)xP#19	18.65
79	(PxKW)xP#20	12.56
80	(PxKW)xP#21	8.25
81	(PxKW)xP#22	12.29
82	(PxKW)xP#23	9.91
83	(PxKW)xP#24	14.34
84	(PxKW)xP#25	12.58
85	(PxKW)xP#26	17.08
86	(PxKW)xP#27	31.55
87	(PxKW)xP#28	22.96
88	(PxKW)xP#29	5.3
89	(PxKW)xP#30	18.04
90	(PxKW)xP#31	23
91	(PxKW)xP#32	23.93
92	(PxKW)xP#33	13.65
93	(PxKW)xP#34	14.26
94	(PxKW)xP#35	30

กรมวิชาการเกษตร

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
Crt+	ส้มแป้น	42.31
Crt-	ส้มสายน้ำผึ้ง	17.03
95	(PxKW)xP#36	21.15
96	(PxKW)xP#37	8.22
97	PxOC#1	14.79
98	PxOC#2	19.04
99	PxOC#3	48.29
100	PxOC#4	9.53
101	PxOC#5	64.84
102	PxOC#6	13.07
103	PxOC#7	10.98
104	PxOC#8	10.73
105	PxOC#9	15.62
106	PxOC#10	11.04
107	PxOC#11	10.83
108	PxOC#12	7.05
109	PxOC#13	10.18
110	PxOC#14	16.76
111	PxOC#15	10.83
112	PxOC#16	8.85
113	PxOC#17	8.64
114	PxOC#18	10.09
115	PxOC#19	10.39
116	PxOC#20	9.12
117	PxOC#21	11.26
118	PxOC#22	10.38
119	PxOC#23	16.23

กรมวิชาการเกษตร

Peroxidase เป็น oxidase enzyme ที่พบทั่วไปในพืชชั้นสูง มีหน้าที่ทำลาย peroxide โดยการเคลื่อนย้าย peroxide ที่ได้จากการสะสมจากกระบวนการ metabolism ในเซล พบว่า peroxidase นี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ ซึ่งกิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อพืชถูกกระตุ้น หรือถูกทำลายโดยเชื้อสาเหตุ โดยที่กิจกรรมของเอ็นไซม์จะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่างกัน การศึกษากิจกรรมหรือปริมาณ peroxidase ที่ไม่เพียงจะเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานโรคแล้ว ยังเป็นแนวทางในการคาดคะเนความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุที่มีอยู่ในพืช (Reuveni *et al.*1992) จากผลการทดลอง พบว่า กิจกรรมของ peroxidase นั้น แตกต่างไปตาม พันธุ์ส้ม โดยต้นส้มลูกผสมที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้กิจกรรม peroxidase จะสะสมหรือมีปริมาณมากบริเวณที่ถูกเชื้อเข้าทำลายและก่อให้เกิดผลการสร้างสาร suberin บริเวณผนังของเซล นับเป็นกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชที่สร้างสิ่งขัดขวางหรือการกักเชื้อโรค (Melillo *et al.* 1992) ในพืชที่ต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อจะกระตุ้นการเกิด O2 ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ทำให้เกิด Cell necrosis และปฏิกิริยาที่เป็น hypersensitivity (Zacheo and Bleve-Zacheo, 1988) เช่นเดียวกับการทดลองในปี 1988 ของ Van lelyveld, L.J และ Van vuuren, S.P. ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ของส้มจะสูงในพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ มะนาวตาฮิติ การศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase สามารถตรวจสอบพันธุ์ส้มต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งหรือช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ส้มต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งเบื้องต้นได้ โดยใช้เป็น biochemical marker ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ทั้งนี้ควรตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมด้วยเพื่อยืนยันผลการทดลองได้อย่างชัดเจน

จากการทดลองที่ได้สิ้นสุดในปี 2559 ซึ่งคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ ในห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ทำให้สามารถ คัดเลือกต้นส้มพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะต้านทานโรคกรีนนิ่งในการทดลองการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง ซึ่งจะดำเนินการในปี 2559 – 2563

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง

1.การเจริญเติบโตและการประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่งในต้นส้มลูกผสม

ปี 2563 ข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นส้มลูกผสม อายุ 3 ปี 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 ตามลำดับ สายต้นที่มีขนาดเส้นรอบวงน้อยที่สุด คือ ExP#32 มีขนาดเส้นรอบวงของลำต้น 8.64 เซนติเมตร ส่วนสายต้นที่มีความสูงของลำต้นมากที่สุด คือ PxOC#4 มีความสูง 330 เซนติเมตร รองลงมา คือ (PxOC)#11 และ (PxOC)#14 มีความสูงของลำต้น 320 และ 315 เซนติเมตร ตามลำดับ สายต้นที่มีความสูงของลำต้นน้อยที่สุด คือ ExP#30 มีความสูงของลำต้น 112 เซนติเมตร ส่วนการเจริญเติบโตทางด้านความกว้างทรงพุ่ม พบว่า สายพันธุ์ที่มีความกว้างทรงพุ่มสูงสุด คือ (PxKW)xP#32 มีความกว้างทรงพุ่ม 251.5 เซนติเมตร รองลงมาคือ สายต้น PxOC#11 และ PxOC#20 มีความกว้างทรงพุ่ม 230 และ 226 เซนติเมตร ตามลำดับ สายต้นที่มีความกว้างของทรงพุ่มน้อยที่สุด คือ ExSP#2 มีความกว้างทรงพุ่ม 75 เซนติเมตร

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#3 และ GWxKW#3 นอกจากนี้ พบว่า มีสายต้นที่แสดงอาการระดับ 2 คือ คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50 % พบทั้งหมด 4 สายต้น ได้แก่ ExP#5, ExSP#5 , ExSP#6, และ ExSP#7 ดังตาราง (ตารางที่ 1)

2. ผลผลิตและคุณภาพผลผลิต

ข้อมูลผลผลิตส้มลูกผสม พบว่า ส้มลูกผสมให้ผลผลิตจำนวน 63 สายต้น จากจำนวนต้นทั้งหมด 96 สายต้น หรือ 65.63% จำนวนต้นทั้งหมด สายต้นที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ PxOC#23 มีผลผลิต 14.47 กิโลกรัมต่อต้น รองลงมา คือ สายต้น PxOC#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 สายต้น ExP#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 และมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ 8.59-13.24 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์เกษตร

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

- ไม่มีข้อมูลเนื่องจากต้นส้มตาย

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%

กรมวิชาการเกษตร

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	-	-	-	-	-	-	-
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

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
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	*	*	*	*	*	*	*
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	-	-	-	-	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
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
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	-	-	-	-	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

ลำดับ	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด (เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
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

3. 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%), และ กลุ่ม Z ซึ่งต้องทำการตรวจซ้ำอีกครั้ง จำนวน 6 สายต้น (6.25%) (ตารางที่ 3)

จากการส่งตัวอย่างใบส้มจากต้นส้ม คัดเลือกต้นส้มลูกผสมจากต้นที่ไม่ปรากฏอาการของโรคและตรวจพบเป็นโรคกรีนนิ่งน้อย คือ กลุ่ม A ที่เป็นโรคกรีนนิ่งน้อย และกลุ่ม N ที่ไม่พบโรคกรีนนิ่ง และให้ผลผลิตส้มลูกผสมโดยมีน้ำหนักผลต่อต้นไม่น้อยกว่า 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		

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

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร

1.การเจริญเติบโตและการประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่งในต้นส้มลูกผสม

ปี 2563 ข้อมูลการเจริญเติบโตของต้นส้มลูกผสม อายุ 4 ปี พบว่า แปลงเกษตรกรจังหวัดน่าน สายต้นที่มีการเจริญเติบโตด้านความสูง และความกว้างทรงพุ่ม และเส้นรอบวงมากที่สุด คือ PxSP มีความสูง 281 เซนติเมตร มีความกว้างทรงพุ่ม 272 เซนติเมตร และมีเส้นรอบวงของลำต้น 28 เซนติเมตร รองลงมา คือ สายต้น KW และ PXKW มีความสูง 272 และ 236 เซนติเมตร ขนาดของทรงพุ่ม 243 และ 231 เซนติเมตร และมีเส้นรอบวงของลำต้น 25 และ 26 เซนติเมตร ตามลำดับ แปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ พบว่า สายต้นที่มีการเจริญเติบโตด้านความสูง และความกว้างทรงพุ่ม และเส้นรอบวงมากที่สุด คือ PxSP มีความสูง 228 เซนติเมตร มีความกว้างทรงพุ่ม 192 เซนติเมตร และมีเส้นรอบวงของลำต้น 22 เซนติเมตร รองลงมา คือ สายต้น PxKW และ SP มีความสูง 224 และ 207 เซนติเมตร ขนาดทรงพุ่ม 180 และ 172 เซนติเมตร และมีเส้นรอบวงของลำต้น 22 และ 17 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงราย พบว่า สายต้นที่มีการเจริญเติบโตด้านความสูง และความกว้างทรงพุ่ม และเส้นรอบวงมากที่สุด คือ PxKW มีความสูง 215 เซนติเมตร มีความกว้างทรงพุ่ม 138 เซนติเมตร และ มีเส้นรอบวงของลำต้น 22 เซนติเมตร รองลงมา คือ สายต้น KW และ PXSP มีความสูง 172 เซนติเมตร ขนาดของทรงพุ่ม 128 และ 97 เซนติเมตร และมีเส้นรอบวงของลำต้น 12 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกรทั้ง 3 จังหวัด พบว่า มีสายต้น PxSP เพียงสายต้นเดียวที่ไม่ปรากฏอาการของโรค ส่วนสายต้น KW และ PxKW พบปรากฏอาการของโรคในระดับ 1 คือ ใบมีขนาดสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง และ ต้นทรุดโทรม จากโรคกรีนนิ่ง < 25% (ตารางที่ 4)

2. ผลผลิตและคุณภาพผลผลิต

ผลผลิตส้มลูกผสมแปลงเกษตรกรจังหวัดน่าน พบว่า สายต้นที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ PxSP มีผลผลิต 38.4 กิโลกรัมต่อต้น รองลงมา คือ สายต้น KW และ PxKW มีผลผลิต 32 และ 30.4 กิโลกรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักต่อผล พบว่า สายต้น KW มีน้ำหนักต่อผลมากที่สุด คือ 108.5 กรัมต่อผล รองลงมา คือ สายต้น PxKW มีน้ำหนักต่อผล 108.1 กรัมต่อผล สายต้นที่มีน้ำหนักต่อผลน้อยที่สุด คือ PxSP มีน้ำหนักต่อผล 87.3 กรัมต่อผล ส้มลูกผสมทั้ง 3 สายต้น มีขนาดผลตั้งแต่ 58.7-63.2 มิลลิเมตร มีจำนวนกลีบ 10.7-11.4 กลีบ จำนวนเมล็ด 11.7-19.9 เมล็ด มีความหนาเปลือก 1.2-1.7 มิลลิเมตร และมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ 11.1-12.5

ผลผลิตส้มลูกผสมแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่ พบว่า สายต้นที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ PxSP มีผลผลิต 42.5 กิโลกรัมต่อต้น รองลงมา คือ สายต้น SP และ PxKW มีผลผลิต 35.5 และ 35.4 กิโลกรัมต่อต้น ส่วนน้ำหนักต่อผล พบว่า สายต้น PxKW มีน้ำหนักต่อผลมากที่สุด คือ 110.1 กรัมต่อผล รองลงมา คือ สายต้น PxSP มีน้ำหนักต่อผล 95.5 กรัมต่อผล

กรมวิชาการเกษตร

สายต้นที่มีน้ำหนักต่อผลน้อยที่สุด คือ SP มีน้ำหนักต่อผล 92 กรัมต่อผล ส้มลูกผสมทั้ง 3 สายต้น มีขนาดผลตั้งแต่ 59.3-65.7 มิลลิเมตร มีจำนวนกลีบ 10-13.2 กลีบ จำนวนเมล็ด 12.5-15 เมล็ด มีความหนาเปลือก 1.2-1.7 มิลลิเมตร และมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ 13.4-14.5

ผลผลิตส้มลูกผสมแปลงเกษตรกรจังหวัดเชียงราย พบว่า สายต้นที่ให้ผลผลิต น้ำหนักต่อผล และขนาดผลสูงสุด คือ PxKW มีผลผลิต 27.5 กิโลกรัมต่อต้น น้ำหนักต่อผล 80 กรัมต่อผล และมีขนาดผล 54 มิลลิเมตร รองลงมา คือ สายต้น KW มีผลผลิต 25.4 กิโลกรัมต่อต้น น้ำหนักต่อผล 50.4 กรัมต่อผล และมีขนาดผล 43 มิลลิเมตร ส่วนสายต้นที่ให้ผลผลิต น้ำหนักต่อผล และขนาดผลน้อยสุด คือ สายต้น PxSP มีผลผลิต 23.5 กิโลกรัมต่อต้น น้ำหนักต่อผล 36 กรัมต่อผล และมีขนาดผล 40 มิลลิเมตร ส้มลูกผสมทั้ง 3 สายต้น มีจำนวนกลีบ 9.4-10.5 กลีบ จำนวนเมล็ด 10.5-14 เมล็ด มีความหนาเปลือก 1.2-1.7 มม. และมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ 15.5-17.4 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ข้อมูลการเจริญเติบโต เส้นรอบวงของลำต้น ความสูง ขนาดทรงพุ่ม และประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร ปี 2563

แปลงเกษตรกร	สายต้น	ความสูง (ซม.)	ขนาดทรงพุ่ม (ซม.)	เส้นรอบวงของลำต้น (ซม.)	ประเมินการเกิดโรคกรีนนิ่ง
น่าน	PxSP	281	272	28	0
	PxKW	236	231	26	1
	KW	272	243	25	1
เชียงใหม่	PxSP	228	192	22	0
	PxKW	224	180	22	1
	SP	207	172	17	1
เชียงราย	PxSP	172	97	12	0
	PxKW	215	138	22	1
	KW	172	128	12	1

หมายเหตุ

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%

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 คุณภาพผลผลิตส้มลูกผสมแปลงเกษตรกรจังหวัดน่าน เชียงใหม่ และเชียงราย ปี 2563

แปลงเกษตรกร	สายต้น	น้ำหนักผล/ต้น (กก.)	น้ำหนัก/ผล (กรัม)	ขนาดผล (มม.)	จำนวนกลีบ (กลีบ)	จำนวนเมล็ด(เมล็ด)	ความหนาเปลือก (มม.)	เปอร์เซ็นต์บริกซ์ (%)
น่าน	PxSP	38.4	87.3	58.7	11.4	19.9	1.2	11.4
	PxKW	30.4	108.1	63.2	10.7	17.6	1.7	12.5
	KW	32.0	108.5	59.6	10.7	11.7	1.7	11.1
เชียงใหม่	PxSP	42.5	95.5	65.7	13.2	14.5	1.2	13.4
	PxKW	35.4	110.1	64.2	11.7	15.0	1.7	13.7
	SP	35.5	92.0	59.3	10.0	12.5	1.3	14.5
เชียงราย	PxSP	23.5	36.0	40.0	9.4	14.0	1.2	15.5
	PxKW	27.5	80.0	54.0	10.5	11.5	1.5	17.4
	KW	25.4	50.4	43.0	10.0	10.5	1.7	16.0

3. การตรวจโรคกรีนนิ่ง

ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกรทั้ง 3 จังหวัด จำนวน 27 ตัวอย่าง โดยสำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ด้วยเทคนิค PCR พบว่า พบเชื้อสาเหตุของโรคกรีนนิ่งเพียงสายต้นเดียว คือ สายต้น PxKW (ชร.) (ตารางที่ 6)

จากการส่งสายต้น PxSP และPxKW เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ Bata-carotene และ Vitamin C ผลการวิเคราะห์ Bata-carotene และ Vitamin C พบว่า สายต้น PxSP มีปริมาณ Bata-carotene 101.42 µg/100g และ Vitamin C มีปริมาณ 8.78 mg/100g และ สายต้น PxKW มีปริมาณ Bata-carotene 108.29 µg/100g และ Vitamin C มีปริมาณ 9.78 mg/100g (ตารางที่ 7)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 ผลการตรวจโรคกรีนนิ่งของส้มลูกผสมในแปลงเกษตรกร ด้วยเทคนิค PCR

ลำดับ	แปลงเกษตรกร	สายต้น	ผลการตรวจ
1	เชียงใหม่	PxSP	-
2		PxSP	-
3		PxSP	-
4		PxKW	-
5		PxKW	-
6		PxKW	-
7		SP	-
8		SP	-
9		SP	-
10	**เชียงราย**	PxSP	-
11		PxSP	-
12		PxSP	-
13		PxKW	-
14		PxKW	-
15		**PxKW**	**+**
16		KW	-
17		KW	-
18		KW	-
19	น่าน	PxSP	-
20		PxSP	-
21		PxSP	-
22		PxKW	-
23		PxKW	-
24		PxKW	-
25		KW	-
26		KW	-
27		KW	-

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ Bata-carotene และ Vitamin C ของส้มลูกผสม

สายต้น	Beta-carotene (µg/100g)	Vitamin C (mg/100)
PxSP	101.42	8.76
PxKW	108.29	9.78

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิเคราะห์ Peroxidase activity ในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จำนวน 119 สายต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 43 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 9 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 37 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 23 ต้น สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มี Peroxidase activity มากกว่าชุดควบคุมลบ คือ ส้มสายน้ำผึ้งซึ่งมีปริมาณ Peroxidase activity 17.03x10^3Unit/mg protein ได้จำนวน 71 ต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 32 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 5 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 26 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 2 ต้น การทดลองนี้เป็นการคัดเลือกส้มลูกผสมเบื้องต้นที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งนำไปสู่การทดลองการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง ซึ่งจะดำเนินการในปี 2559 – 2563 โดยปลูกต้นกล้าส้มลูกผสมคู่ต่างๆ ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ Peroxidase activity ลงในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ทำการคัดเลือกต้นที่ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ข้อมูลอาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อโรคกรีนนิ่ง วิเคราะห์ตัวอย่างใบส้มที่สงสัยว่าจะติดเชื้อกรีนนิ่งทุก 3 เดือนร่วมกับ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืชเพื่อให้ได้ส้มลูกผสมที่มีลักษณะทนทานต่อโรคกรีนนิ่งอย่างแท้จริง

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

การคัดเลือกต้นส้มที่ต้านทานหรือทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง พบว่า สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งตามเกณฑ์ คือ ได้ต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของโรคหรือปรากฏอาการใบ

กรมวิชาการเกษตร

มีขนาดเล็ก สีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0-25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatus liberibacter asiaticus*) ทั้งนี้ต้องเป็นต้นที่สามารถให้ผลผลิตส้มลูกผสมโดยมีน้ำหนักผลต่อต้นไม่น้อยกว่า 2.5 กิโลกรัมต่อต้นขึ้นไปและมีเปอร์เซ็นต์บริกซ์ไม่น้อยกว่า 8 องศาบริกซ์ สามารถคัดเลือกต้นที่มีคุณสมบัติตามเกณฑ์ดังกล่าว 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#22 จากการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ได้นี้จะนำไปทดสอบระดับความทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคต่อไปในระดับห้องปฏิบัติการ แปลงทดสอบและแปลงเกษตรกรต่อไป เพื่อให้ได้ต้นส้มลูกผสมที่มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมได้

การทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสม ส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร พบว่า สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มีความทนทานต่อโรคกรีนนิ่งตามเกณฑ์ คือ ได้ต้นส้มที่ไม่ปรากฏอาการของโรคหรือปรากฏอาการใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 0-25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อตรวจสอบในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง (*Candidatus liberibacter asiaticus*) ได้ 1 สายต้น คือ PxSP ซึ่งสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ทั้งสามพื้นที่ และยังพบว่ามีปริมาณ Bata-carotene สูง จากการทดสอบยังพบอีกว่าผลของส้มมีการสุกแก่ก่อนส้มเขียวหวาน และส้มสายน้ำผึ้งประมาณ 1 เดือน รสชาติของน้ำคั้นมีรสที่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค คือ มีรสเปรี้ยวนำหวานและมีกลิ่นหอมของส้มสายน้ำผึ้งอยู่ด้วย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

นักวิชาการเกษตร หรือผู้สนใจสามารถนำวิธีการคัดเลือกต้นส้มที่ต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งโดยวิธีการประเมินอาการที่สัมพันธ์กับโรคจากต้นส้มร่วมกับการตรวจเชื้อสาเหตุโรคโดยใช้เทคนิคทางอนูวิทยา ได้แก่ RT-PCR และ PCR เพื่อตรวจสอบยืนยันการเกิดโรคกรีนนิ่งร่วมด้วย สามารถตรวจสอบโรคได้อย่างถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว ทำให้สามารถกำจัดต้นส้มที่เป็นโรคได้อย่างรวดเร็วและลดการแพร่ระบาดของโรคได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ที่ร่วมปฏิบัติงานและเก็บข้อมูลในการทดสอบนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรที่ให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบโรคกรีนนิ่งในห้องปฏิบัติการ จนการทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

ดารุณี ปุญญพิทักษ์ เยาวภา ตันติวานิช และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. การตรวจสอบเชื้อ *Candidatus Liberibacter* species สาเหตุโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ด้วยเทคนิค Real-time PCR Detection *Candidatus Liberibacter* 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.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลผลิตสินค้าเกษตร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http:// www. oae.go.th/ewt_news.php?nid=13577. (วันที่สืบค้นข้อมูล 2 กรกฎาคม 2556).

MARTINEZ, A.L., and J.M. WALLACE 1967. Citrus leaf-mottle-yellows disease in the Philippines and transmission of the casual virus by a psyllid, *Diaphorina citri*. Plant Dis. Rep. 51:692-95.

McClean, A.P.D. and P.C.J. Oberholzer. 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease ofsweet orange. South Afr. J. Agric. Sci. 8:297-298.

Melillo M.T., T. Bleve-Zacheo and G. Zacheo. 1992. Role of peroxidase and esterase isozymes in pea roots infected with *Heterodera goettingiana*. Nematol medit. 20 171-179.

Nakashima K., Y. Ohtsu and M. Prommintara. 1998. Detection of greening organism in citrusplants and Psylla*Diaphorinacitri* in Thailand.Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64:153-159.

Reuveni. R., M. Shimori.; Z. Karchi, and J. Kuc. 1992. Peroxidase activity as biochemical marker for resistance of muskmelon (Cucumismelo) to Pseudoperonospora cubensis. Phytopath. 82 :749-753.

Van lelyveld, L.J และ Van vuuren, S.P. 1988. Peroxidase activity as a marker in greening disease of citrus for assessment of tolerance and susceptibility. Phytopathology J. 121:357-362.

Zacheo. G., and T. Bleve-Zacheo. 1998. Involvement of superoxide dismutases and Superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. Physiological and Molecular Plant Pathology. 32 : 313.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1 เตรียมตัวอย่างใบส้มเพื่อวิเคราะห์ Peroxidase activity

ภาพผนวกที่ 2 ต้นส้มลูกผสมที่แสดงอาการปกติ ไม่ปรากฏอาการของโรคกรีนนิ่ง ในแปลง ศวพ.น่าน ก.ต้นส้มสายพันธุ์ (PxKW)xP#29 ข. ต้นส้มสายพันธุ์ ExP#20

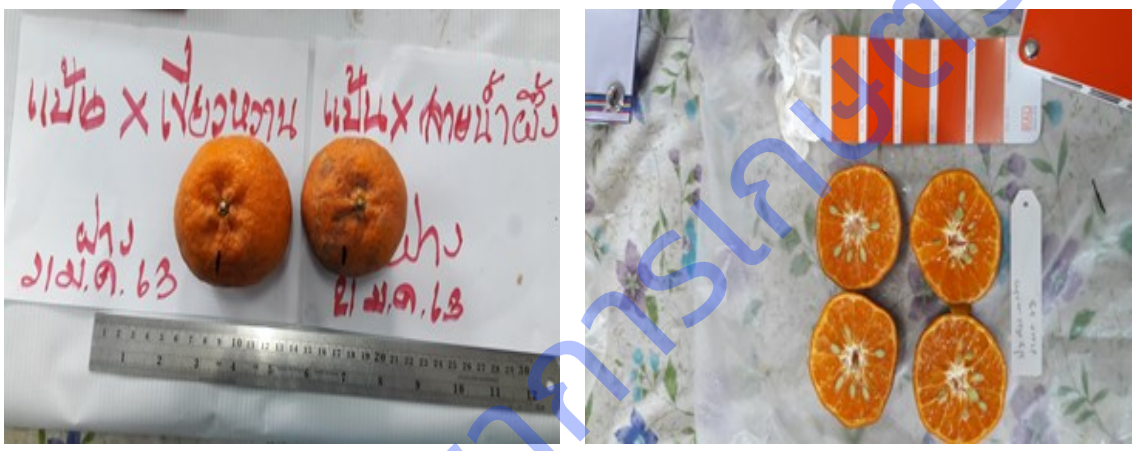
กรมวิชาการเกษตร

ภาพผนวกที่ 3 ต้นส้มลูกผสมสายต้น GWxSP#1 เริ่มแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งอยู่ในระดับ 1 ใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง < 25% ในแปลง ศวพ.น่าน

ภาพผนวกที่ 4 ต้นส้มลูกผสมสายต้น ExSP#9 เริ่มแสดงอาการของโรคกรีนนิ่งอยู่ในระดับ 1 ใบมีขนาดเล็กสีเหลือง ยอดชี้ตั้ง ต้นทรุดโทรมจากโรคกรีนนิ่ง 25-50% ในแปลง ศวพ.น่าน

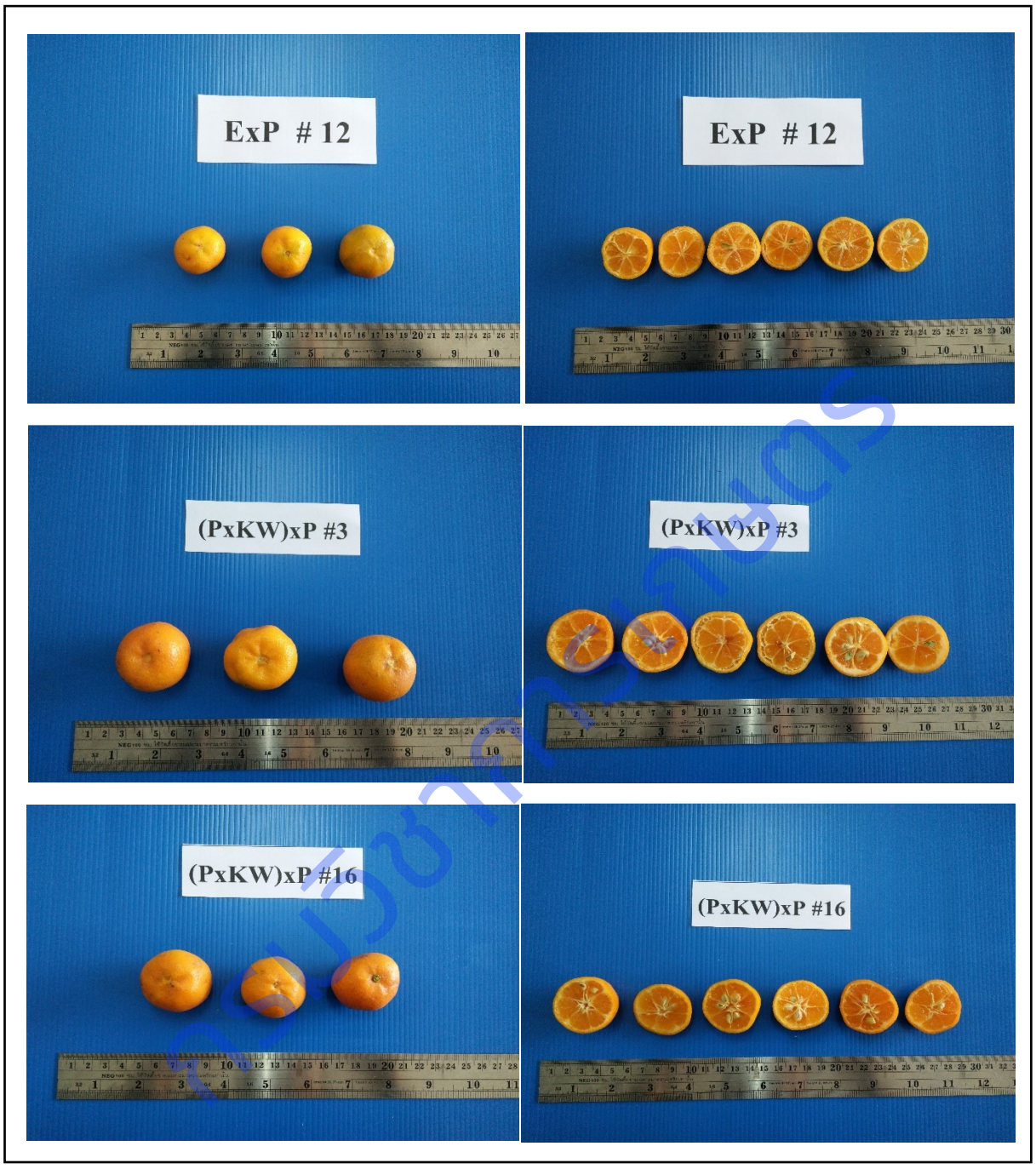
ภาพผนวกที่ 5 ต้นส้มลูกผสม PxKW (ก) และต้นส้มลูกผสม PxSP (ข)

ภาพผนวกที่ 6 ลักษณะผลส้มลูกผสม PxKW (ก) และ PxSP (ข)

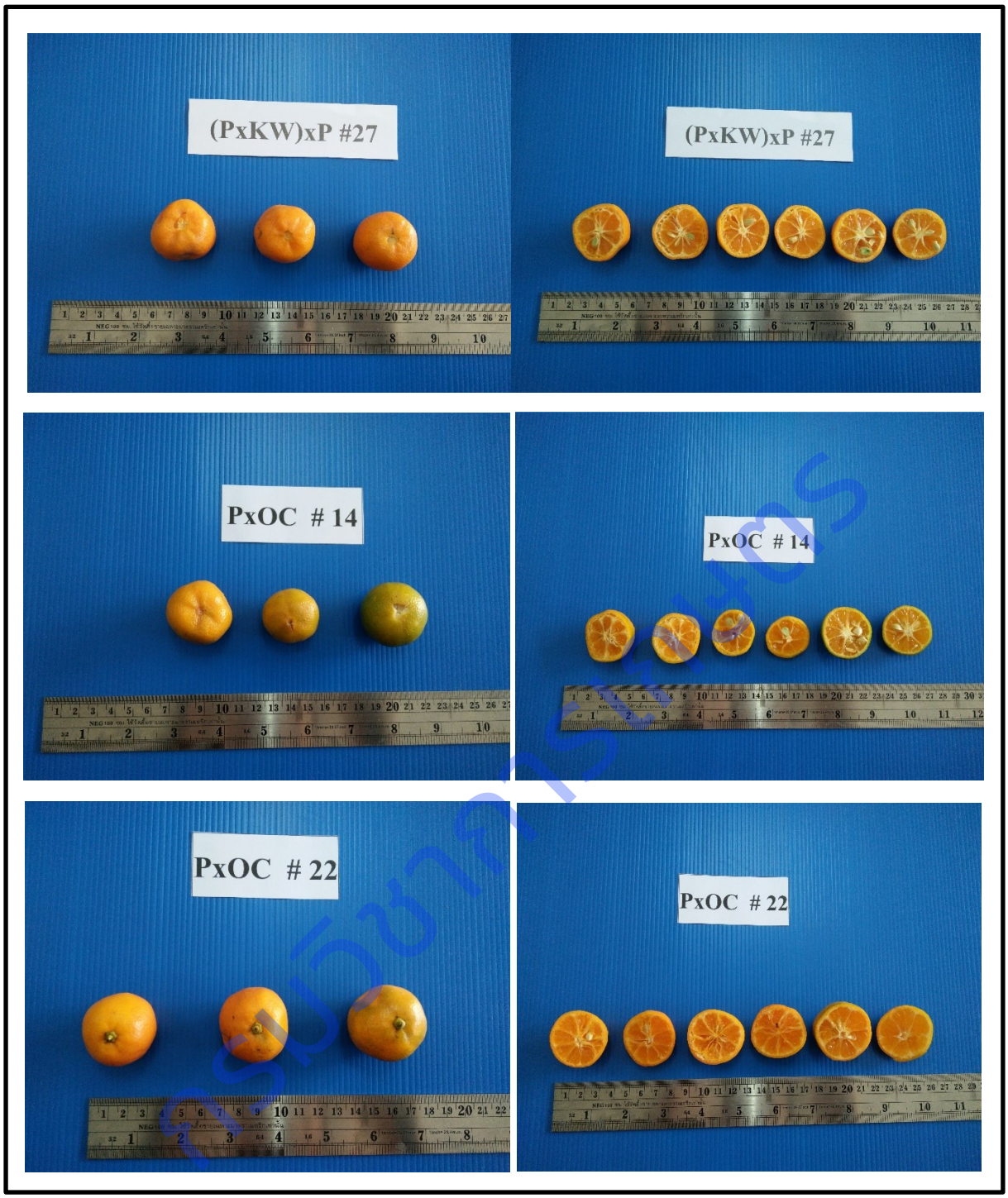


ภาพผนวกที่ 7 ลักษณะภายนอก ภายในผลส้มลูกผสม PxKW (ก) และ PxSP (ข)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพผนวกที่ 8 ลักษณะภายนอกและภายในผลส้มลูกผสมสายต้น ExP#12, (PxKW)xP#3 และ (PxKW)xP#16



ภาพผนวกที่ 9 ลักษณะภายนอกและภายในผลส้มลูกผสมสายต้น (PxKW)xP#27, PxOC#14 และ 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 ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อ เป้าหมายที่ต้องการตรวจ ดำเนินการด้วยวงจรของระดับอุณหภูมิต่างๆ ที่กำหนดในเครื่อง real time PCR สำหรับ probe มีการติดสี Fluorescence ซึ่งเป็นตัวตรวจจับผลของ PCR product ที่เกิดขึ้น โดยไม่ต้องนำไปผ่านเทคนิค gel electrophoresis

2. การตรวจโรคกรีนนิ่งโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบส้ม

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างส้มด้วยวิธี CTAB buffer โดยตัดตัวอย่างใบส้มที่สุ่มมาจากแปลงทดสอบเฉพาะส่วนของเส้นกลางใบ 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-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 ดูดของเหลวใสส่วนบน ปริมาตร 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 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 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 Jagoueix et. 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

กรมวิชาการเกษตร

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH2O) 7.0 ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (OI1) (10 pmol) 1.0 ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ 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

กรมวิชาการเกษตร

ภาพผนวกที่ 9 ภาพเจล (1% agarose gel) จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *'Ca.* L. asiaticus' ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ OI1/OI2c ของตัวอย่างใบส้มจากแปลงทดสอบของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน

M = 1kb DNA Ladder (fermentas®)

1 – 40 คือ 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

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 1 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาอุณหภูมิสูงสุดจากสถานีตรวจอากาศจังหวัดน่าน ปี 2558-2563

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	28.5	32.6	35.7	34.9	35.8	34.2	32.4	31.6	32.0	31.9	32.9	28.7
2559	28.2	30.6	35.8	38.6	35.5	33.0	31.8	31.1	31.7	32.6	31.6	29.7
2560	29.2	32.8	36.1	34.8	34.0	33.5	32.3	32.5	32.4	31.4	31.1	26.8
2561	29.2	31.4	34.1	34.2	33.7	31.8	31.3	30.9	32.6	32.8	-	32.8
2562	31.12	35.04	37.32	39.42	38.41	35.54	33.55	32.09	33.60	34.30	32.70	30.50
2563	33.3	37.3	36.9	37.1	33.5	33.4	30.8	30.8	31.8	30.7	31.7	29.6

ตารางผนวกที่ 2 ข้อมูลอุตุนิยมวิทยาอุณหภูมิต่ำสุดจากสถานีตรวจอากาศจังหวัดน่าน ปี 2558-2563

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	13.1	15.3	19.6	20.8	23.7	24.2	23.9	24.1	24.0	21.9	20.5	17.8
2559	14.0	14.7	18.6	22.6	23.8	24.1	24.1	24.0	24.0	23.0	20.4	16.3
2560	17.3	14.9	19.0	21.9	23.7	24.4	23.9	23.9	23.9	22.8	19.9	15.9
2561	16.1	16.2	18.4	21.5	23.2	24.2	24.2	24.0	23.5	22.6	-	22.6
2562	17.9	17.6	19.5	23.1	25.6	25.6	25.0	24.7	22.4	23.0	20.1	14.4
2563	15.0	14.7	19.0	22.2	24.4	24.7	24.5	24.2	24.2	22.1	19.0	14.2

ตารางผนวกที่ 3 อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ปี พ.ศ.2558-2563 (°C)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	26.9	31.2	34.0	33.9	35.1	34.3	32.5	31.5	32.1	31.1	30.6	28.1
2559	27.0	30.0	34.6	38.3	35.5	32.3	31.0	31.5	31.6	31.4	29.9	27.9
2560	27.0	31.3	34.7	33.3	33.0	32.6	31.0	31.3	31.6	30.5	29.5	26.7
2561	27.3	30.5	32.1	32.0	32.2	31.3	31.4	30.9	31.9	30.9	30.0	27.8
2562	28.5	32.3	34.6	38.1	37.7	34.6	33.0	31.7	32.5	33.1	31.2	28.0
2563	30.7	32.5	36.4	35.8	36.2	33.7	32.9	31.1	32.0	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 4 อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ปี พ.ศ.2558-2563 (°C)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	13.1	13.4	16.9	20.1	23.3	23.8	23.2	31.5	22.5	20.2	18.7	16.0
2559	11.6	13.6	17.5	20.9	22.7	23.4	23.0	23.0	22.6	21.4	19.4	15.4
2560	15.8	14.1	16.8	20.8	22.6	23.3	23.1	23.2	22.8	21.9	18.9	14.9
2561	14.9	15.0	17.9	20.1	22.0	23.2	23.5	23.0	22.2	21.3	17.9	17.2
2562	16.0	14.1	16.2	19.8	23.6	23.7	23.4	22.9	21.6	20.8	18.0	12.2
2563	12.8	13.9	16.2	20.0	21.1	23.4	23.3	23.4	23.7	-	-	-

ตารางผนวกที่ 5 อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ปี พ.ศ.2558-2563 (°C)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	26.7	30.4	33.6	33.7	32.9	31	30.5	29.3	28.2	30.2	26.9	25.9
2559	26.6	30.4	33.6	38.6	34.1	31	30.5	31.3	32.7	32.2	29.9	27.9
2560	27	30.6	34	33.1	31.8	31.6	30.2	30.4	31	29.9	28.9	26.8
2561	30.3	32.3	32.1	31.4	30.2	30.2	29.7	31.8	29.9	29.8	28.6	30.3
2562	28.3	31.9	34.6	37.2	37.1	33.7	33.2	31.6	31.9	32.6	31	28.3
2563	29.9	31.5	35	36.2	34.4	32.6	32.9	30.6	32.2	30.3	30.3	28.9

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 6 อุณหภูมิสูงต่ำเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ ปี พ.ศ.2558-2563 (°C)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	13.6	13.1	16.4	19.9	18.8	23.3	21.8	23.1	22.2	20.9	19.1	15.1
2559	13.7	13.1	17.4	21.1	23.1	23.3	21.8	23.1	23.3	22.6	20.1	16.1
2560	16.4	14.4	17.1	21	23	24.2	23.6	24	23	22	19.8	15.4
2561	14.6	17.8	20.5	21.9	23.6	23.8	23.5	23.2	22	17.8	17.3	14.6
2562	15	14	16.4	20.1	24.2	24.3	24.3	23.5	21.9	21	18.5	12.4
2563	12.4	13.6	16.2	20.1	22.4	23.9	23.4	23.2	23.1	20.8	17.5	14.1

ตารางผนวกที่ 7 ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่านปี พ.ศ.2558-2563 (มม.)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	45.7	0.1	97.2	119.0	17.1	63.8	141.5	152.0	197.3	46.9	18.1	62.6
2559	68.3	0.2	0.0	86.4	207.1	142.7	242.3	409.7	185.1	37.8	7.2	0.3
2560	41.3	0.0	7.7	95.4	96.7	64.1	320.5	238.2	99.9	84.4	1.2	42.2
2561	12.3	25.1	23.0	82.5	92.1	158.0	313.4	197.6	189.6	14.4	0.0	14.4
2562	89.2	3.3	3.9	65.6	158.4	137.4	225.6	440.1	91.1	59.5	0.9	0.2
2563	0.0	0.3	9.2	109.4	135.0	148.4	85.4	395.5	147.1	9.8	0.4	0.0

ตารางผนวกที่ 8 ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ปี พ.ศ.2558-2563 (มม.)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	1.8	0.0	0.4	7.5	3.9	3.0	5.9	8.0	2.6	3.7	2.0	1.2
2559	1.2	0.7	0.0	0.5	6.2	7.9	5.4	8.2	9.2	6.5	2.7	0.0
2560	2.3	0.0	0.0	5.8	9.6	6.9	12.6	11.3	9.3	8.2	0.8	2.5
2561	0.2	0.7	0.0	6.5	13.0	6.1	5.9	10.0	8.2	6.4	1.9	1.4
2562	1.7	0.0	0.0	0.5	4.2	1.4	6.1	9.2	2.1	0.8	0.5	0.6
2563	0.0	0.0	0.2	3.4	3.4	7.3	7.1	12.8	7.7	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 9 ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย ณ ศูนย์วิจัยศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่พ.ศ.2558-2563 (มม.)

ปี พ.ศ.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
2558	130.5	0	102.9	124.7	152.7	267.5	263.5	166.3	181.1	198.4	8.9	0
2559	50.7	0	0	30.1	172.7	187.5	263	166.2	151.1	131.2	138	0.4
2560	188.8	0	2.4	123.6	195.1	118.3	399.6	205.6	234.9	341.3	16.2	64.9
2561	17	2.7	5	157.2	376.6	155.4	192.6	319.7	187.9	341.9	64.4	110.6
2562	56.3	0	0	26.1	141	110.4	85	382.1	128.2	28	24.3	0
2563	0	0	1	112.2	150.8	126.2	133.8	414.4	155.8	70.5	73	0

กรมวิชาการเกษตร

ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์ดิน แปลงทดสอบพันธุ์ส้มลูกผสมส้มเขียวหวาน และสายน้ำผึ้งที่ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลงเกษตรกร จังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดน่าน

แปลงวิเคราะห์	pH	อินทรียวัตถุ Organic matter (%)	ฟอสฟอรัส Avai P (mg/kg)	โพแทสเซี่ยม Avai k (mg/kg)	แคลเซี่ยม Ca (mg/kg)	แมกนีเซี่ยม Mg (mg/kg)
แปลงที่ 1	6.1	1.98	28	107	1091	196
แปลงที่ 2	5.6	3.48	8	245	940	134
แปลงที่ 3	3.98	2.08	24.24	81.50	-	-
แปลงที่ 4	5.98	1.54	51.5	139.0	577.5	199.8
ค่าที่เหมาะสม	6-7	2.5-3	26-42	130	1040	135

หมายเหตุ

แปลงที่ 1 แปลงคัดเลือกส้มลูกผสมชุดที่ 2 ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน

แปลงที่ 2 แปลงคัดเลือกส้มลูกผสมแป้นxเขียวหวาน แป้นxสายน้ำผึ้ง จังหวัดน่าน

แปลงที่ 3 แปลงคัดเลือกส้มลูกผสมแป้นxเขียวหวาน แป้นxสายน้ำผึ้ง จังหวัดเชียงราย

แปลงที่ 4 แปลงคัดเลือกส้มลูกผสมแป้นxเขียวหวาน แป้นxสายน้ำผึ้ง จังหวัดเชียงใหม่

กรมวิชาการเกษตร

บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด
Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd.
สาขาเชียงใหม่ : 164/86 หมู่ที่ 3 ต.ดอนแก้ว อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ 50180
Chiangmai Branch : 164/86 Moo 3 Donkaew, Maerim, Chiangmai 50180 Thailand
Tel : (66) 0 5389 6131, (66) 0 5389 6133 Fax : (66) 0 5389 6052, (66) 0 5389 6131 ต่อ 705
http://www.centrallabthai.com

Central Lab

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 15 ธันวาคม 2563
เลขที่รายงาน TRCM63/29885
หน้า 01/01

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า นายทวีพงษ์ ณ.น่าน
128 ม. 1 (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน) ต. ผาสิงห์ อ. เมืองน่าน จ. น่าน

รายละเอียดตัวอย่าง (ข้อมูลจากลูกค้า) ส้มแป้น x เขียวหวาน

รหัสตัวอย่าง CM63/11220-001

ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : ส้มสด
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก, จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 2.50 กิโลกรัม
อุณหภูมิขณะรับ : อุณหภูมิห้อง, สภาพตัวอย่างปกติ

วันที่รับตัวอย่าง 03 ธันวาคม 2563

วันที่ทดสอบ 03 ธันวาคม 2563 - 15 ธันวาคม 2563

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Beta-carotene	108.29	µg/100g	-	KHON KAEN AGR. J. 42 SUPPL. 1 : (2014)
Vitamin C	9.78	mg/100g	-	Compendium of method for food analysis (2003) p2-112 to 2-114

หมายเหตุ : ทดสอบเฉพาะในเนื้อเท่านั้น

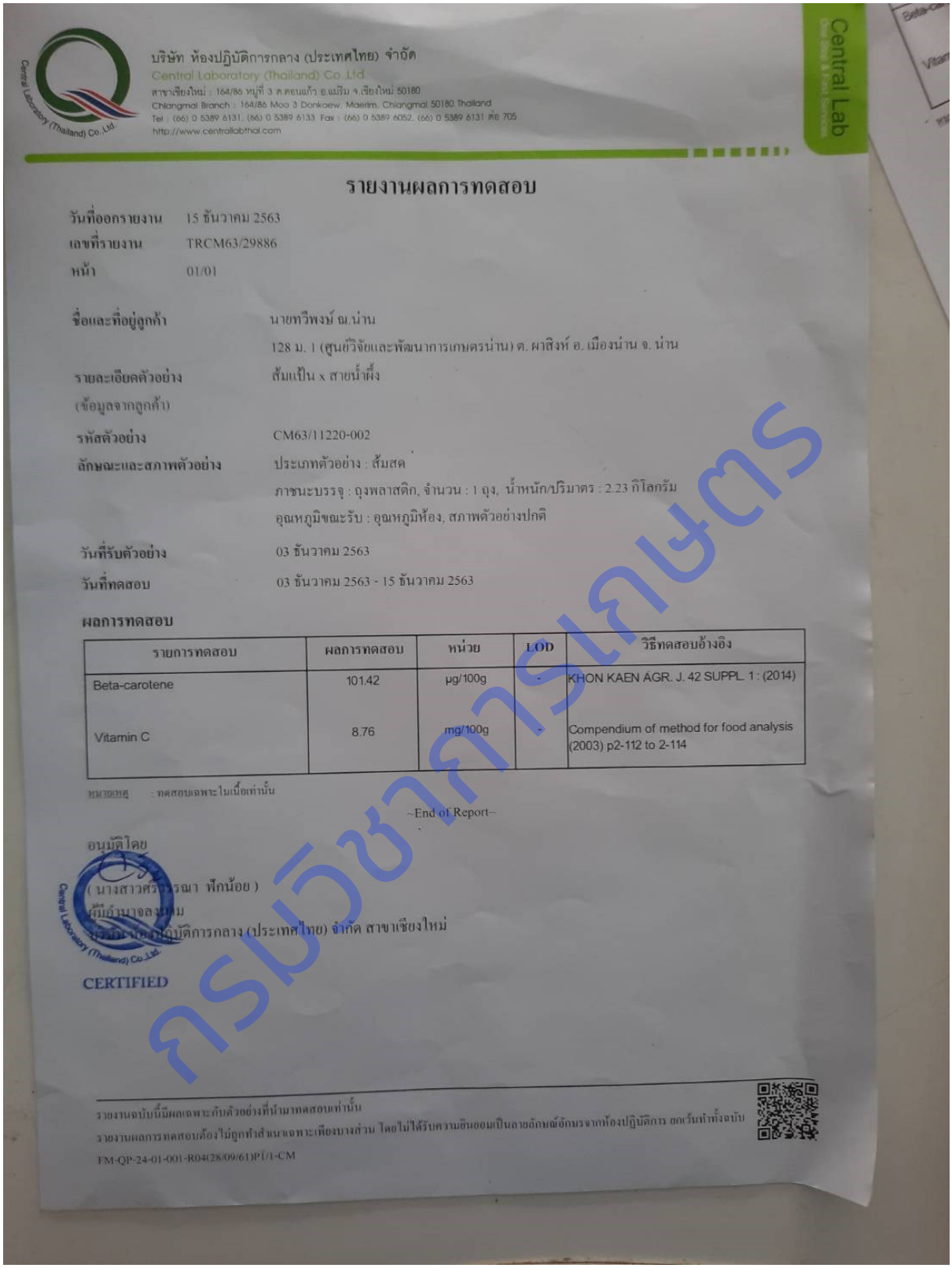
--End of Report--

อนุมัติโดย
(นางสาวศิริวรรณา ฟักน้อย)
ผู้มีอำนาจลงนาม
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่

CERTIFIED

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น
รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทั้งฉบับ

ศูนย์วิจัยการเกษตร



บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด
Central Laboratory (Thailand) Co.,Ltd.
สาขาเชียงใหม่ : 164/86 หมู่ที่ 3 ต.ดอนแก้ว อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ 50180
Chiangmai Branch : 164/86 Moo 3 Donkaew, Maerim, Chiangmai 50180 Thailand
Tel : (66) 0 5389 6131, (66) 0 5389 6133 Fax : (66) 0 5389 6052, (66) 0 5389 6131 ต่อ 705
http://www.centrallabthai.com

Central Lab

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ออกรายงาน 15 ธันวาคม 2563
เลขที่รายงาน TRCM63/29886
หน้า 01/01

ชื่อและที่อยู่ลูกค้า นายทวีพงษ์ ณ.น่าน
128 ม. 1 (ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน) ต. ผาสิงห์ อ. เมืองน่าน จ. น่าน

รายละเอียดตัวอย่าง (ข้อมูลจากลูกค้า) ส้มแป้น x สายน้ำผึ้ง

รหัสตัวอย่าง CM63/11220-002

ลักษณะและสภาพตัวอย่าง ประเภทตัวอย่าง : ส้มสด
ภาชนะบรรจุ : ถุงพลาสติก, จำนวน : 1 ถุง, น้ำหนัก/ปริมาตร : 2.23 กิโลกรัม
อุณหภูมิขณะรับ : อุณหภูมิห้อง, สภาพตัวอย่างปกติ

วันที่รับตัวอย่าง 03 ธันวาคม 2563

วันที่ทดสอบ 03 ธันวาคม 2563 - 15 ธันวาคม 2563

ผลการทดสอบ

รายการทดสอบ	ผลการทดสอบ	หน่วย	LOD	วิธีทดสอบอ้างอิง
Beta-carotene	101.42	µg/100g	-	KHON KAEN AGR. J. 42 SUPPL. 1 : (2014)
Vitamin C	8.76	mg/100g	-	Compendium of method for food analysis (2003) p2-112 to 2-114

หมายเหตุ : ทดสอบเฉพาะในเนื้อเท่านั้น

~End of Report~

อนุมัติโดย
(นางสาวศรีวรรณา ฟักน้อย)
ผู้มีอำนาจลงนาม
บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด สาขาเชียงใหม่

CERTIFIED

กรมวิชาการเกษตร

รายงานฉบับนี้มีผลเฉพาะกับตัวอย่างที่นำมาทดสอบเท่านั้น
รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ ยกเว้นทำทั้งฉบับ

กรมวิชาการเกษตร