

วิธีการทดสอบใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. ตัดเส้นใยของเชื้อราทดสอบ นำมาวางกึ่งกลางบนผิวหน้าอาหารที่ผสมสารเคมีแต่ละชนิด นำไปบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 5 วัน (เส้นใยของเชื้อทดสอบบนอาหารPDA ที่ไม่ผสมสารเคมี ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ เจริญเต็มผิวหน้าจานอาหาร)

8.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราต่อการควบคุมโรคยอดไหม้ลำไยในสภาพสวน

คัดเลือกสารเคมี 4 ชนิด มาจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการบนสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา(ข้อ 2) ที่พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี จึงได้ทำการคัดเลือกสารเคมีเหล่านี้ได้แก่ benalaxil + mancozeb (Leela-M) ,benomyl (Benlate OD), captan (Ortho) และ carbendazim (Bavistin) มาทำการทดลองในสภาพสวนต่อไป :

สภาพการทดสอบ

- ชนิดของพืชที่ใช้ทดสอบ ลำไยพันธุ์ดอ อายุ 15 ปี จำนวน 25 ต้น
- สถานที่ทำการทดสอบ สวนลำไยคุณไพโรจน์ ปันวารี 55/2 ม.4 ต.ลิ อ.ลิ จ.ลำพูน
- ระยะเวลาที่ทำการทดสอบ เริ่มตั้งแต่เดือนธันวาคม 2540
- ระยะปลูกและความสูงต้น โดยเฉลี่ย 4.5 และ 5 เมตร ตามลำดับ
- การดูแลรักษาอื่น ๆ มีการให้น้ำโดยสูบน้ำบาดาล ต่อท่อไปที่ต้น, ฉายหญ้าด้วยเครื่องตัดหญ้าขนาดเล็ก
- สภาพแวดล้อม พื้นที่อยู่ติดแม่น้ำลำปาว สภาพอากาศเย็นและค่อนข้างหนาวมีหมอกจัดตอนเช้า

คัดเลือกต้นลำไยพันธุ์ดอที่แสดงอาการยอดไหม้ที่มีขนาดของต้นและอัตราการเกิดโรคใกล้เคียงกัน (บริเวณที่แสดงอาการยอดไหม้รอบทรงพุ่มโดยเฉลี่ยประมาณ 40% ของต้น)จำนวน 25 ต้นทำการผูก Tag สีกับต้นตามกรรมวิธีที่กำหนด คือ

กรรมวิธีที่ 1. Control กรรมวิธีเปรียบเทียบ ฉีดพ่นด้วยน้ำ 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 2. benomyl อัตรา 10g/20 L จำนวน 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 3. benalaxil + mancozeb อัตรา 50g/20 L จำนวน 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 4. captan อัตรา 40g /20L จำนวน 5 ต้น

กรรมวิธีที่ 5. carbendazim อัตรา 20g/20Lจำนวน 5 ต้น

ทุกกรรมวิธีผสมสารจับใบ(Besmor) อัตรา 5cc /20 L ทำการพ่นด้วยเครื่องพ่นสารเคมีขนาดเล็ก โดยทำการฉีดพ่นให้ทั่วทรงพุ่ม หลังจากพ่นแล้วปล่อยให้ใบแห้งพอสมควร แล้วคลุมช่อยอดที่มีใบแสดงอาการใบไหม้ คลุม 2 ช่อต่อต้นด้วยถุงตาข่ายไนลอนเพื่อใช้บันทึกผลการลุกลามของใบไหม้ในบริเวณที่คลุมไว้ ฉีดพ่นด้วยสารเคมีทุก 10 วัน จำนวน 2 ครั้ง

8.1.4 การทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่เป็นแอนตาโกนิสต์ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุ

ใช้เชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B4 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากผิวใบลำไย ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อราหลายชนิดที่เป็นสาเหตุโรคเน่าของผลลำไย มาทำการทดสอบโดยการให้โคโคเนียของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบนี้เจริญเข้าหากันบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราไว้ขอบด้านหนึ่งของจาน

อาหาร ส่วนขอบอีกด้านหนึ่งใช้วิธีการนำเข็มเขี่ยตะไคร่ของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจิดเป็นแนวประมาณ 2.5 ซม. นำไปบ่มเชื้อไว้ รอให้เชื้อเจริญเข้าหากันเพื่อตรวจสอบปฏิกริยาการยับยั้งการเจริญโดยเชื้อแบคทีเรีย

ผลการทดลอง

8.1.1 การสำรวจการแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้ของลำไยในพื้นที่ปลูกในเขตอำเภอ

ได้พบว่าการแพร่ระบาดของโรคยอดไหม้รุนแรงในช่วงเดือนตุลาคม - เดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2539 ต่อมาในระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2540 ก็ได้พบการแพร่ระบาดของโรคนี้แต่พบว่าไม่มีความรุนแรงเหมือนปีที่ผ่านมา ทั้งนี้เนื่องจากสภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงแตกต่างจากปีที่ผ่านมา โดยในฤดูกาลนี้พบว่าระยะที่มีอากาศหนาวเย็นเกิดล่าช้ากว่าปีที่ผ่านมา จากการสังเกตพบว่าการระบาดของโรคเกิดขึ้นรุนแรง ถ้าสภาพอากาศหนาวเย็นและมีหมอกจัดในตอนเช้า

ได้ทำการแยกเชื้อจากตัวอย่างใบที่เป็นโรคและเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากอาการใบไหม้นี้สามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็ว เส้นใยมีสีขาวและเจริญเต็มผิวหน้าอาหาร PDA ภายใน 5 วัน เมื่อตรวจสอบลักษณะของเส้นใยพบว่ามิลักษณะคล้ายกับเชื้อ *Rhizoctonia* sp. และไม่พบการสร้างสปอร์ จัดเป็นเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม *Mycelia sterilia* แต่เมื่อเพาะเลี้ยงไปนานๆบนอาหาร สีของเส้นใยจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลปนเทาและจะเกิดการจับกลุ่มเส้นใยเป็นกลุ่มก้อนเป็นเม็ด ๆ เส้นใยที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร(PDA)เป็นเวลามากกว่า 7 วัน เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบโครงสร้างลักษณะคล้าย chlamydospore

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคด้วยการปลูกเชื้อราที่แยกได้ใหม่ๆจากตัวอย่างโรค ลงบนต้นกล้าของลำไย พบว่าสามารถทำให้เกิดอาการใบไหม้ได้ในบริเวณที่ปลูกเชื้อมีเส้นใยสีขาวเจริญแผ่ออกมาจากชิ้นไม้ที่วางบนผิวหน้าใบ ปกคลุมส่วนผิวใบและบริเวณที่วางชิ้นไม้เกิดรอยแผลสีน้ำตาลแต่ไม่ทำให้เกิดอาการไหม้ชัดเจนเหมือนอาการที่พบในธรรมชาติ แต่เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเป็นเวลานาน ๆ เมื่อนำมาปลูกเชื้อ พบว่าจะสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยจะไม่ทำให้เกิดแผลบนใบเหมือนเชื้อที่แยกจากตัวอย่างใหม่ ๆ แต่ยังมีเส้นใยสีขาวเจริญจากชิ้นไม้ที่ใช้ปลูกเชื้อลามไปยังผิวใบ

8.1.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิด พบว่าสารเคมีในกลุ่ม benalaxil+mancozeb (Leela-M) ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยที่เส้นใยของเชื้อไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ผสมสารเคมีชนิดนี้ได้ รองลงมาได้แก่สาร benomyl (Benlate OD), carbendazim (Derosal) และ captan (Ortho) ตามลำดับ โดยที่สาร cyproconazole (Alto100) และ phosethyl-Al(Aliette) นั้น เส้นใยของเชื้อรา ยังคงสามารถเจริญได้บ้าง แต่ช้ากว่าเส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA เพียงอย่างเดียวที่ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ (Table 106) (Figure 108)

Table 106. Efficacy of some fungicides to suppress mycelial growth of longan shoot blight mold

Treatment	Diameter of mycelial growth (cm)*
ciproconazol	2.22
phosethyl-Al	3.64
benomyl	0.84
carbendazim	0.86
captan	0.96
metalaxyl + mancozeb	1.10
benalaxil + mancozeb	0.50
control	9.00

* = average from 5 replications, measured when incubated for 5 days.

(diameter of mycelial disc = 0.50 cm.).



Figure 108. Efficacy of some fungicides to suppress mycelial growth of longan shoot blight mold on PDA testing by poison food method.

8.1.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่มีต่อเชื้อราสาเหตุโรคยอดไหม้ของลำไย ในสภาพสวน

พบว่าในสภาพการแพร่ระบาดของโรคในฤดูกาลที่ผ่านมา (พฤศจิกายน-ธันวาคม 2540) ไม่มีความรุนแรงเหมือนช่วงปลายปี 2539 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีแต่ละชนิดจึงไม่มีความแตกต่างอย่างเด่นชัด เมื่อทำการบันทึกผลจากบริเวณซอกที่คลุมตาข่ายไว้พบว่าอาการใบไหม้ ไม่ได้ลุกลามไปยังใบที่

ยังปกติ เพราะแม้แต่ในกรรมวิธีเปรียบเทียบ(control) ซึ่งฉีดพ่นแต่เพียงน้ำและสารจับใบ ก็พบว่าอาการของโรคไม่ได้ลุกลามไปยังใบปกติเช่นกัน โดยใบที่แสดงอาการไหม้ในตอนแรกเริ่มของการทดลองก็แห้งหลุดร่วงอยู่ภายในถุงตาข่าย ไม่ได้เกิดอาการใบไหม้ขึ้นใหม่ลุกลามไปยังใบปกติ ซึ่งเกิดขึ้นเหมือนกันในทุกกรรมวิธี ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสภาพภูมิอากาศในฤดูกาลนี้ไม่เอื้ออำนวยต่อการแพร่ระบาดของโรค จึงทำให้อาการใบไหม้หายไปเองตามธรรมชาติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากสภาพโดยรวมของสวนที่ทำการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา พบว่าสภาพใบมีความสมบูรณ์อย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากอาการใบจุดและอาการของราดำได้ใบที่มีปรากฏอยู่บ้างในช่วงก่อนการทดลองหายไปเช่นกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา

8.1.4 ผลการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียแอนทาโกนิสต์เพื่อควบคุมเชื้อสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B4 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีสมบัติเป็นแอนทาโกนิสต์โดยมีการยับยั้งแบบการสร้างสารปฏิชีวนะออกมา (antibiosis) ที่สามารถยับยั้งเชื้อราหลายชนิดที่เป็นสาเหตุโรคเน่าของผลลำไยได้ แต่เมื่อนำมาทำการทดสอบกับเชื้อราที่แยกจากอาการใบไหม้พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุใบไหม้นี้ได้ โดยเส้นใยของเชื้อราสามารถเจริญเข้าหาและข้ามโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B4 และในที่สุดก็มีเส้นใยขึ้นปกคลุมทั้งจานอาหาร

สรุปผลการทดลอง

ในการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคใบไหม้ในเขตอำเภอลี้ จังหวัดลำพูน ซึ่งเคยมีการแพร่ระบาดรุนแรงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน 2539 ต่อมาพบว่าในระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2540 มีการระบาดของโรคนี้น้อยลงเนื่องจากสภาพภูมิอากาศแตกต่างจากปีที่มีการแพร่ระบาดรุนแรงซึ่งมีอากาศหนาวเย็นและมีหมอกจัดในตอนเช้า เพราะระยะเวลาที่มีอากาศหนาวเย็นในช่วงปลายปี 2540 มีช่วงระยะเวลาสั้น ๆ สวนที่พบปัญหาเป็นสวนที่ไม่ได้มีการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันมาก่อน แสดงให้เห็นว่าการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่แนะนำสามารถควบคุมและป้องกันการระบาดของโรคนี้ได้ เชื้อราที่แยกได้จากอาการใบไหม้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเป็นเวลาาน ๆ พบว่าเชื้อสูญเสียความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยเมื่อนำไปปลูกเชื้อกับใบลำไยพบเพียงเส้นใยสีขาวเจริญแผ่ออกไปบาง ๆ จากชิ้นวุ้นที่นำมาวางบนใบลำไยเท่านั้น ไม่ทำให้เกิดอาการรอยแผลขึ้นเหมือนกับเชื้อที่แยกใหม่ ๆ จากอาการไหม้ตามธรรมชาติ ต่อมาเมื่อทำการสำรวจในช่วงปลายปี 2541 จนถึงปัจจุบันก็ยังไม่พบรายงานการแพร่ระบาดของโรคนี้อีก จึงไม่สามารถทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสาเหตุ (Etiology) ของการเกิดโรคนี้นวมไปถึงการควบคุมเชื้อในสภาพสวนตามธรรมชาติต่อไปได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ก็ได้แนวทางในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรค หากสภาพอากาศในปีใดมีหมอกจัดในตอนเช้าและมีอากาศหนาวเย็น ก็ให้มีการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่แนะนำไว้ก่อนเพื่อเป็นการลดแหล่งสะสมของเชื้อดังกล่าว

8.2 โรคใบจุดสนิมของลำไย

อาการใบจุดสนิมเป็นอาการที่ปรากฏบนบริเวณหน้าใบลำไยโดยมีอาการเป็นจุดสีน้ำตาลแดงคล้ายสนิมเหล็ก จากการตรวจสอบพบว่าเกิดจากสาเหตุที่เป็นปรสิตบนใบพืช *Cephaleuros* sp. (*Cephaleuros virescens*) โดยปกติแล้วมักจะพบในแหล่งปลูกลำไยโดยทั่ว ๆ ไปและมักไม่ทำความเสียหายให้กับลำไยเท่าใดนัก แต่ถ้าหากมีการแพร่ระบาดมาก ๆ จะทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพและผลผลิตของลำไย

จากรายงานส่วนใหญ่พบว่าสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มสารประกอบทองแดง (copper fungicide) ให้ประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดสนิมนี้ที่เท่ากับไม้ผลชนิดต่างๆ ได้ผล แต่จากประสบการณ์ของผู้ประกอบการโรงรับรมผลลำไยด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กล่าวว่าลำไยที่มาจากสวนที่มีการใช้ copper fungicide นี้นิพจน์ในขณะลำไยเริ่มติดผล ผลตกค้างของสารเคมีชนิดนี้จะทำให้ลำไยที่ผ่านการรมด้วยซัลเฟอร์มีผลสีดำนวลไม่สวยงาม ดังนั้นแนวทางการศึกษาในด้านการป้องกันกำจัดโรคนี้จะได้มีการพิสูจน์และหาสารเคมีชนิดอื่นทดแทนกลุ่มสารประกอบทองแดงมาใช้ในการป้องกันกำจัด

- วัตถุประสงค์
1. เพื่อทำการพิสูจน์ว่าผลของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราประเภทสารประกอบทองแดงที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดสนิม ที่ตกค้างบนผลลำไยนั้นเมื่อทำการรมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จะเป็นผลทำให้ผิวของผลมีสีดำนวลจริงหรือไม่
 2. เพื่อให้ได้ชนิดของสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดสนิมของลำไย

วิธีการทดลอง

8.2.1 การทดสอบผลตกค้างของสารประกอบทองแดงบนผลลำไยที่มีต่อสีผิวของผลลำไยที่ผ่านการรมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์

ได้ทดลองแช่ผลลำไยในสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่างๆ คือ carbendazim (เดอโรซาล) benalaxil + mancozeb (ลิลาเอ็ม) propineb (แอนทราโคล) copper oxychloride (คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์, คูปราวิท) และ captan (ออร์โธ) โดยใช้อัตราสูงสุดที่แนะนำข้างฉลาก เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำขึ้นมาปล่อยให้แห้ง เก็บไว้ในถุงพลาสติกทั้งไว้ข้ามคืน แล้วนำมารมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์โดยการเผาฟองกำมะถัน 4 กรัม ภายในตู้ที่บ่มที่มีผลลำไยวางเรียงอยู่ในถาดพลาสติก โดยทำการรมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และได้นำกระดาษกรองที่ชุบด้วยสารเคมีชนิดเดียวกับที่ใช้แช่ผลลำไย เข้าไปรมภายในตู้ด้วย เพื่อดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นภายหลังรมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์

8.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่าง ๆ กับใบลำไยที่มีอาการจุดสนิม

สนิม

เก็บใบลำไยที่มีอาการจุดสนิมนำมาแช่ในสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดต่าง ๆ คือ carbendazim (เดอโรซาล) benalaxil + mancozeb (ลีลาเอ็ม) propineb (แอนทราโคล) copper oxychloride (คอปเปอร์ไฮด์รอกไซด์, คูปราวิท) และ captan (ออร์โธ) อัตราสูงสุดที่แนะนำข้างฉลาก เป็นเวลา 10 นาที ทำตัวเปรียบเทียบโดยใช้ใบแช่ในน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อ (ทุกกรรมวิธีผสมสารจับใบ Besmor อัตรา 5 cc / 20 L) แล้วนำใบขึ้นมาปล่อยให้แห้งพอสมควร แล้วนำใบลำไยเหล่านี้ไปวางไว้ในกล่องพลาสติกที่มีกระดาษสำหรับเพาะเมล็ดชุบน้ำกลั่นเพื่อเป็นการให้ความชื้นภายในกล่อง บ่มไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิ 25°C แล้วนำใบที่ผ่านการชุบสารเคมีชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ มาตรวจบริเวณจุดสนิมด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อบันทึกผล

ผลการทดลอง

8.2.1 ผลการทดสอบลำไยที่แช่ด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่เป็นสารประกอบทองแดง ได้แก่ คูปราวิท และคอปเปอร์ไฮด์รอกไซด์

หลังจากผ่านการรมด้วยซัลเฟอร์ไดออกไซด์แล้ว ลำไยจะมีสีดำคล้ำชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับผลลำไยที่แช่ด้วยสารเคมีตัวอื่น ๆ และที่ไม่ได้แช่สาร ซึ่งจะมีสีของผิวเหลืองนวล และกระดาษกรองที่ชุบด้วยคูปราวิทและคอปเปอร์ไฮด์รอกไซด์ ก็มีสีน้ำตาลออกดำเกิดขึ้นชัดเจน ในขณะที่กระดาษกรองที่ชุบด้วยสารเคมีตัวอื่น ๆ และชุบด้วยน้ำกลั่น ไม่มีการเปลี่ยนสี

8.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราชนิดต่าง ๆ

ผลการตรวจสอบบริเวณจุดสนิมบนใบลำไยที่ผ่านการแช่สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าบริเวณแผลที่มีกลุ่มโคโลนีของสาหร่ายสีส้มบนใบที่ผ่านการแช่สารเคมี carbendazim, benalaxil + mancozeb, และ copper oxychloride เกิดการฟ่อและยุบตัวมีสีน้ำตาลดำในทุกจุดแผล เมื่อเปรียบเทียบกับใบที่ผ่านการแช่สารเคมี propineb ที่มีกลุ่มโคโลนีมีสีน้ำตาลดำและมีการยุบตัวบางส่วนประมาณ 50% ของจุดแผล และใบที่แช่ใน captan และน้ำกลั่นพบว่ากลุ่มโคโลนีของสาหร่ายยังคงมีสีส้มอยู่ ไม่มีการยุบตัว

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเป็นการยืนยันว่าสารประกอบทองแดงที่ตกค้างบนผิวของผลลำไย จะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยากับซัลเฟอร์ไดออกไซด์เกิดเป็นคอปเปอร์ซัลไฟด์ในขณะทำการรม เป็นผลทำให้ผลลำไยมีสีดำไม่สวยงามตามที่ผู้ประกอบการได้อ้างถึง ดังนั้นการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราจึงควรหลีกเลี่ยงการใช้สารประกอบทองแดง เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สนิมไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ไม่ทำปฏิกิริยากับซัลเฟอร์มาทดสอบกับใบโดยตรง และสามารถเลือกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดอื่น ๆ เช่น carbendazim benalaxil และ mancozeb มาใช้ทดแทน

8.3 โรคราดำใต้ใบของลำไย

ในสภาพอากาศที่มีความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างสูง มักจะสำรวจพบโรคราดำใต้ใบของลำไยในพื้นที่ปลูกลำไย โดยทั่วไปแล้วโรคนี้ไม่ได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลำไย แต่ถ้าหากมีการแพร่ระบาดมาก ๆ ก็จะทำให้ใบกรอบกรอบเนื้อที่ใบทำให้ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงลดลง และมักจะพบว่ามีแมลง เช่น เพลี้ยแป้งและสาหร่ายบนใบพืชเจริญร่วมอยู่ด้วย

วัตถุประสงค์ เพื่อทราบลักษณะการเข้าทำลายบนใบ และได้วิธีการป้องกันกำจัด

วิธีการทดลอง

ทำการตัดตัวอย่างใบแบบ free hand section และ ตัดแบบ freezing ด้วย microtome และทดสอบการเพาะเลี้ยงเชื้อสาเหตุบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่พัฒนาขึ้นด้วยการเลียนแบบกับสภาพธรรมชาติบนผิวใบที่เชื้อรามักเจริญบริเวณที่มีน้ำหวานที่เกิดจากแมลง เช่น เพลี้ยแป้งผลิตขึ้นบนผิวใบ โดยใช้น้ำผึ้งเป็นสารอาหารให้กับเชื้อ

ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบเชื้อโดยการตัดตัวอย่างใบที่มีเชื้อราสีดำเจริญอยู่พบว่าเกิดจากเชื้อรา *Meliola* sp. และจากการตัดแบบ freezing ด้วย microtome พบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อบนใบลำไย จะเจริญโดยเกาะอยู่ที่ผิวใบโดยที่ไม่ได้แทงส่วนของเส้นใยผ่านชั้น parenchyma เข้าไปภายในใบลำไย (Figure 109) และการเจริญบนใบลำไยมีหลายรูปแบบ ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละสวน โดยอาจพบเชื้อเจริญเฉพาะใต้ใบ และมักจะมีแมลงเช่นตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาวและเพลี้ยหอยร่วมอยู่ด้วย เนื่องจากแมลงเหล่านี้จะขับสารเหนียวที่มีความหวาน ทำให้เชื้อชนิดนี้เจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ยังพบได้บริเวณหน้าใบ แต่จะมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เจริญใต้ใบ แต่เมื่อตรวจสอบพบว่าเชื้อชนิดเดียวกันทั้งหน้าใบและใต้ใบ

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ การทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อยังไม่สามารถกระทำได้ เพราะเชื้อราชนิดนี้ไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้บนอาหารทั่วไป จึงได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Meliola* sp. นี้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำผึ้งที่เจือจางลงให้ได้ความเข้มข้น 25% และ 12.5% แล้วนำมา spread ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA และ WA แล้วทำการแยกเชื้อแบบ single spore isolation และแบบชุดเอาเส้นใยบนใบลงบนอาหารที่เตรียมไว้ แต่ไม่พบการเจริญของเชื้อชนิดนี้บนอาหาร ส่วนใหญ่มักจะแยกเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ที่เจริญขึ้นมาแทนหลังการบ่มเชื้อไว้มากกว่า 1 สัปดาห์



Figure 109. Fruiting body and mycelia of black mold on cuticle of longan leaf surface.

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรากับโรคจุดสนิมและราดำได้ใบ

การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคจุดสนิมและราดำได้ใบ ได้ทำการทดลองบนต้นลำไยในสภาพสวนตามธรรมชาติ เพราะยังไม่สามารถหาวิธีเลี้ยงเชื้อราสาเหตุทั้งสองนี้ได้บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ จึงได้วางแผนการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการป้องกันกำจัดเชื้อราในโปรแกรมเดียวกันกับการควบคุมโรคใบจุดดำ เพราะในสภาพสวนตามธรรมชาติมักจะพบโรคเหล่านี้เกิดร่วมกัน ซึ่งผลการทดลองจะรวมอยู่ในเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อสาเหตุของโรคใบจุดดำของลำไยในสภาพสวน

8.4 โรคกิ่งปมของลำไย

จากการสำรวจพื้นที่ปลูกลำไยในเขตอำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ ได้พบต้นลำไยที่แสดงอาการที่เซลล์ขยายเจริญมากผิดปกติตรงบริเวณกิ่ง ทำให้เกิดเป็นลักษณะปม (gall) เมื่อผ่าดูบริเวณปมนี้สามารถตรวจพบแมลงและหนอนหลายชนิดอาศัยอยู่ภายใน ซึ่งแต่ละปมก็จะพบชนิดของแมลงที่แตกต่างกันออกไป จึงคาดว่าแมลงเหล่านี้ไม่ใช่สาเหตุในการทำให้เกิดปมขึ้นแต่ได้เข้ามาอาศัยและอาศัยอยู่หลังจากที่เกิดปมขึ้นแล้ว จากรายงานที่เกี่ยวข้องพบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *agrobacterium* โดยเฉพาะเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่สามารถทำให้เกิดปมตามกิ่งและลำต้นของพืชหลายชนิดรวมทั้งไม้ยืนต้น จึงได้ลองทำการแยกเชื้อจากอาการปมของลำไยโดยใช้อาหารคัดเลือกเฉพาะ (Selective medium)

วัตถุประสงค์ เพื่อทำการพิสูจน์หาสาเหตุของการเกิดอาการกิ่งปมของลำไย

วิธีการทดลอง

นำกิ่งปมที่เก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ มาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการล้างน้ำให้สะอาดและแช่ใน 1% sodium hypochlorite หรือ 70% ethanol 15 – 30 นาที ล้างน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง จากนั้นใช้มีดตัดส่วนที่เป็นแผลสีน้ำตาล (necrosis) ออกให้หมด แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ประมาณ 5 มม. ใส่ใน phosphate buffer โดยใส่ให้พอท่วม

นำไปเข้าเครื่องเขย่า Vortex mixer ทุก 5 นาทีจนกระทั่งประมาณ 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 – 3 ชั่วโมง (หรือสามารถเก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น) ก่อนนำมาแยกเชื้อบนอาหารคัดเลือกเฉพาะ M1A [L-arabitol 3.04 g, NH_4NO_3 0.16 g, KH_2PO_4 0.54 g, K_2HPO_4 1.04 g, Sodium taurocholate 0.29 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, agar 15 g, crystal violet 0.1 % (w/v) aqueous 2 ml, distilled water 1 l]

นำไปป้อนเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °C ไว้ประมาณ 4 – 7 วัน เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ M1A ได้ถูกนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งโดยเก็บโคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหาร PDA และเก็บลง slant PDA เพื่อนำเชื้อที่ได้เหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยปลูกเชื้อบนต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนและต้นกล้าลำไยพันธุ์ดออายุ 1 เดือนที่ได้จากการเพาะเมล็ด โดยเตรียมเป็น bacterial suspension ความเข้มข้นประมาณ 10^8 - 10^9 cfu/ml แล้วใช้เข็มฆ่าเชื้อจุ่ม bacterial suspension นำมาสะกิดทำให้เกิดแผลบริเวณโคนต้น แล้วคลุมถุงพลาสติกไว้เพื่อรักษาความชื้นบริเวณต้นเป็นเวลา 30 วัน และนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

อีกวิธีการหนึ่งได้ทดสอบกับชิ้นแครอท(ปอกเปลือกแครอทแล้วนำมาผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 95% ethanol, 70% ethanol และ 20% clorox เป็นเวลา 15 นาทีแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งตัดเป็นชิ้นหนาประมาณ 5 มม. แล้วนำไปวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองให้ความชื้นรองอยู่) แล้วหยดด้วย

bacterial suspension (10^6 - 10^7 cfu/ml) บ่มไว้ประมาณ 5 วัน นอกจากนี้ได้นำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test) บางประการ เพื่อการจำแนกชนิด

ผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่างๆบนอาหาร MIA จำนวน 4 isolates คือ SPT1, SPT2, SPT3 (จากกิ่งปมที่เก็บจากอำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่) และ LPH 1 (จากตัวอย่างกิ่งปมที่เก็บจากจังหวัดลำพูน) ลักษณะของโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร MIA พบว่าโคโลนีกลมนูนขอบเรียบเป็นมัน มีลักษณะโคโลนีและระยะการเจริญของเชื้อตรงกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* แต่ในทุก isolates เมื่อนำมาปลูกเชื้อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนและต้นกล้าลำไยพันธุ์ดออายุ 1 เดือนที่ได้จากการเพาะเมล็ด ยังไม่พบว่าทำให้เกิดอาการปุ่มปมกับต้นกล้าทั้ง 2 ชนิดหลังการปลูกเชื่อนานกว่า 8 สัปดาห์ ยังคงเป็นเพียงตุ่มสะเก็ดสีน้ำตาลเล็ก ๆ ที่เกิดจากการทำแผลตอนปลูกเชื้อ ซึ่งจากการตรวจสอบเอกสารอ้างอิงพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้กับการทำให้เกิดอาการปุ่มปมในไม้เนื้อแข็งบางชนิด อาจจะแสดงอาการหลังการปลูกเชื่อนานกว่า 1 ปี รวมทั้งการปลูกเชื้อแบบ artificial inoculation ก็เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่พืชไม่แสดงอาการเพราะสภาพการเข้าทำลายของเชื้อแตกต่างจากสภาพธรรมชาติ

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนชิ้นแครอท พบว่าเกิดอาการแผลขยายบวมขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่ชัดเจนนักในบริเวณที่หยด bacterial suspension ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับความจำเพาะเจาะจงกับพืชอาศัย (host-specific) ที่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์หรือ biovar ของเชื้อที่แยกได้ จึงอาจจะไม่แสดงอาการที่ชัดเจนบนชิ้นแครอทเสมอไป

ผลการตรวจสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ (Table 107) ได้ทำการตรวจสอบเพียงบางลักษณะเพื่อเทียบกับเอกสารอ้างอิง ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้ครบทุกลักษณะโดยเฉพาะการใช้คาร์โบไฮเดรตหรือน้ำตาล และกรดชนิดต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคที่พบใหม่ยังไม่มีการแพร่ระบาดในแหล่งปลูกทั่วไป แต่ตั้งข้อสังเกตไว้ว่าเชื้ออาจแพร่ติดไปกับกิ่งตอน เมื่อนำไปปลูกในที่ใหม่และลำไยมีอายุมากขึ้นก็อาจแสดงอาการของโรคนี้ได้ จึงเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคในเบื้องต้นคือควรหลีกเลี่ยงการใช้กิ่งพันธุ์ที่ปรากฏอาการของโรคเพื่อไม่ให้โรคนี้แพร่ไปยังแหล่งปลูกอื่น ๆ สำหรับการศึกษาเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคนี้โดยอาศัยสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ยังไม่สามารถศึกษาถึงการจำแนกชนิดได้ถึงในระดับ biovar เพียงแต่ดูว่ามีสมบัติบางประการที่ตรงกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เท่านั้น

การศึกษาวิจัยในโครงการนี้เป็นเพียงแค่หาสาเหตุเบื้องต้นของโรคนี้ ส่วนการศึกษาเพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อจำเป็นต้องใช้วิธีการอื่น ๆ เข้ามาช่วย เช่นการใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยา โดยตรวจสอบ

สมบัติเชื้อทดสอบกับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* biovar ต่าง ๆ ที่ได้มีการศึกษาวิจัยไว้แล้วหรือการใช้
วิธีทางชีวโมเลกุลเข้ามาตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ เป็นต้น

Table 107. Major differential characteristics of the biovars of the genus *Agrobacterium*

Diagnostic test	<i>Agrobacterium</i> Biovar :			Isolate :			
	1	2	3	SPT1	SPT2	SPT3	LPH1
3-Ketolactose production	+	-	V	ND	ND	ND	ND
Growth in 2% NaCl	+	-	+	+	+	+	+
Growth at 35 °C	+	V	V	+	+	+	+
Action on litmus milk	al	ac	al	al	al	al	al
Oxidase reaction	+	V	V	+	+	+	+
L-tyrosine utilization	-	+	-	ND	ND	ND	ND
Citrate utilization	V	+	+	-	+	-	+
Ferric ammonium citrate	+	V	V	ND	ND	ND	ND
Acid from Sucrose	+	-	V	+	-	+	-
Erythritol	-	+	-	ND	ND	ND	ND
Melezitose	+	-	-	ND	ND	ND	ND
Alkali from Malonic acid	-	+	+	ND	ND	ND	ND
L-tartaric acid	-	+	+	ND	ND	ND	ND
Propionic acid	V	-	-	ND	ND	ND	ND
Mucic acid	-	+	-	ND	ND	ND	ND

V = variable response al = Alkaline reaction ac = Acidification ND = not determined.

8.5 โรคใบจุดดำของลำไย

โรคใบจุดดำของลำไย ลักษณะอาการของโรค มักเกิดกับใบแก่เริ่มแรกจะเกิดเป็นจุดสีน้ำตาลอ่อน ต่อมาแผลเริ่มแห้งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ บางครั้งอาจพบเส้นใยหรือส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา เช่น fruiting body ของเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., และ *Phyllosticta* sp. นอกจากนี้บริเวณที่เป็นรอยแผลจุดดำ มักพบเส้นใยเป็นขุยสีขาวเจริญอยู่ สำหรับใบที่ยังอ่อนอยู่อาจพบจุดสีเขียวเข้มในเนื้อใบ โดยจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อส่องใบดูกับแสงแดด โรคนี้จะแพร่ระบาดในสภาพอากาศที่มีความชื้นสูง โดยเฉพาะในฤดูฝน หากกระบาดรุนแรง จะทำให้ใบสูญเสียพื้นที่ในการสังเคราะห์แสง ทำให้สภาพต้นทรุดโทรม และผลิตผลลดลง จัดเป็นโรคที่ยังมีความสับสนในเรื่องของเชื้อสาเหตุ จากผลการศึกษาที่ผ่านมา มีรายงานว่าสาเหตุเกิดจากเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Pestalotiopsis* sp., *Phialophora* sp., *Phyllosticta* sp. (พัฒนา และคณะ, 2537) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถแยกเชื้อราได้หลายชนิดจากใบลำไย เช่น *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., และ *Lasiodiplodia* sp. (เสนีย์, 2530 , ปริญา, 2538) ดังนั้นการศึกษในครั้งนี้จึงต้องการพิสูจน์หาเชื้อสาเหตุที่แท้จริงของโรคใบจุดดำของลำไย รวมทั้งหาแนวทางในการควบคุมหรือป้องกันกำจัดโรคที่เหมาะสมต่อไป

- วัตถุประสงค์
1. เพื่อทำการพิสูจน์เชื้อสาเหตุที่แท้จริงของโรค
 2. เพื่อให้ได้ชนิดของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโรคใบจุดดำในสวนลำไยที่มีประสิทธิภาพ
 3. การคัดเลือกจุลินทรีย์แอนตาโกนิสต์เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมโรคใบจุดดำโดยชีววิธี

วิธีการทดลอง

8.5.1 การพิสูจน์เชื้อสาเหตุของโรคใบจุดดำ ได้มีขั้นตอนการวิจัยดังนี้

ก. การแยกเชื้อราจากอาการใบจุดดำของลำไย

ทำการเก็บตัวอย่างใบลำไยที่แสดงอาการใบจุดดำจากสวนในพื้นที่ปลูกแหล่งต่างๆ นำมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวใบ โดยล้างน้ำไหล 10 – 15 นาทีแล้วนำมาแช่ในสารละลาย sodium hypochlorite 1 % นาน 3 – 5 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง แยกเชื้อโดยการตัดเอาส่วนของเนื้อเยื่อใบบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นแผลจุดและส่วนที่ยังปกติ ขนาดโดยประมาณ 3 X 3 มม. แล้วย้ายมาวางบน Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากที่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของชิ้นใบ ทำการย้ายเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยวิธี hyphal tip isolation นำไปเลี้ยงบน PDA เพื่อการศึกษาและจำแนกชนิดต่อไป

ข. การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบลำไยของเชื้อราที่แยกได้

- วิธี Detached Leaf Technique(DLT)

เด็ดใบลำไยปกติที่ยังอ่อนอยู่และไม่เป็นโรคล้างด้วยน้ำสะอาดที่ไหลตลอดเวลา ทั้งไว้ประมาณ 3 - 5 นาที แล้วนำมาผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นใช้ 70% ethanol ชุบสำลีเช็ดผิวใบลำไยทั้งหน้าใบและใต้ใบ ผึ่งลมให้แห้ง ใช้สำลีชุบน้ำกลั่นหนึ่งชามแช่เชื้อหุ้มก้านใบไว้ เพื่อป้องกันไม่ให้ใบลำไยเหี่ยวแห้งเร็วจนเกินไปทำเครื่อง

หมายโดยเขียนหมายเลขเชื้อที่จะทำการทดสอบบนใบ แล้วนำไปวางไว้ในกล่องพลาสติกที่เช็ดทำความสะอาดด้วย 70%ethanol ให้ความชื้นภายในกล่องโดยใช้กระดาษสาที่หนึ่งชามแช่แล้ว พ่นด้วยน้ำกลั่นหนึ่งชาม เชื้อให้หุ้มวางทับด้วยตระแกรงพลาสติก ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหาร ใช้เข็มเย็บติดชิ้นวุ้นที่เจาะแล้ว นำไปวางลงบนใบลำไยทั้งด้านหน้าใบและใต้ใบ ปิดฝากล่องให้สนิท นำกล่องไปเก็บไว้ในตู้ความชื้น 25°C การปลูกเชื้อลงบนใบอ่อนของลำไยนี้ได้แบ่งเป็นทำแผลบนใบและไม่ทำแผล การทำแผลนั้นทำโดยใช้เข็มแทงผ่านยางลบจำนวน 4 เล่มโดยให้ปลายเข็มโผล่จากยางลบเท่า ๆ กัน นำไปกดลงบนใบลำไยจะทำให้ใบลำไยเป็นแผล จากนั้นจึงใช้ชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญอยู่วางทับบนแผล ทำการทดลองกับใบแก่ด้วยด้วยวิธีการเดียวกันนี้ บันทึกผลเมื่ออาการปรากฏบนใบ

- วิธีการปลูกเชื้อลงบนต้นกลาลำไย

ต้นกลาลำไยที่ใช้เป็นต้นกล้าพันธุ์ดอ ที่เพาะจากเมล็ดอายุประมาณ 2 เดือน การเลือกต้นลำไยนั้นเลือกต้นที่มีใบสมบูรณ์ไม่แสดงอาการของโรค ใช้สำลีชุบน้ำกลั่นเช็ดทำความสะอาดบริเวณผิวใบด้านบนให้ทั่ว ผึ่งลมให้แห้งแล้วแช่เชื้อที่ผิวที่ใบโดยเช็ดด้วย 70%ethanol ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปวางเรียงไว้ใน moist chamber จากนั้นใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะโคโลนีของเชื้อที่ใช้ทดสอบ ใช้เข็มเย็บติดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อนำไปวางลงบนใบลำไยของต้นกล้าที่เรียงไว้ใน moist chamber ดังกล่าว โดยการวางชิ้นวุ้นทดสอบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อ 2 ชนิดไว้ด้วยกันใน 1 ใบ และตำแหน่งการวางชิ้นวุ้น จะวางบนใบลำไยโดยวางชิ้นวุ้นตำแหน่งใบที่อยู่ตรงกันข้ามกันในต้นเดียวกัน โดยทำกรรมวิธีละ 5 ช้ำ ในกรรมวิธีเปรียบเทียบบั้นวางชิ้นวุ้น PDA ที่ไม่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้เครื่องทำความชื้นวางไว้ใน moist chamber โดยเปิดเครื่องทำความชื้น 6 ชั่วโมงต่อวัน

กรรมวิธีที่ปลูกเชื้อร่วมกัน ประกอบด้วย *Colletotrichum* sp. + *Pestalotiopsis* sp., *Colletotrichum* sp. + *Phomopsis* sp., *Colletotrichum* sp. + *Helminthosporium* sp., *Colletotrichum* sp. + *Zygosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. + *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis* sp. + *Helminthosporium* sp., *Pestalotiopsis* sp. + *Zygosporium* sp., *Phomopsis* sp. + *Helminthosporium* sp., *Phomopsis* sp. + *Zygosporium* sp. และ *Zygosporium* sp. + *Helminthosporium* sp.

ค. วิธีการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่แฝงอยู่ภายในเนื้อเยื่อใบลำไยด้วยสารละลายของ paraquat

โดยการนำใบลำไยที่แสดงอาการใบจุดและใบปรกติไม่เป็นโรค นำไปล้างน้ำแล้วแช่ทิ้งไว้ 6 ชม. จากนั้นนำไปแช่ใน 95% ethanol นาน 4 วินาทีและแช่ใน 2% sodium hypochlorite นาน 4 นาทีแล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย paraquat (เตรียมจาก Gramoxone® ของบริษัท Zeneca Agrochemicals) โดยแบ่งเป็นกรรมวิธีต่างๆคือที่ความเข้มข้น 0.3% และ 0.5% ในแต่ละความเข้มข้น แช่นาน 1, 2 และ 4 นาที แล้วนำไปบ่มเชื้อใน moist chamber บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นบนใบ เช่นการเจริญของเส้นใยหรือการสร้างสปอร์

ง. การศึกษาอาการ latent infection

นำใบอ่อนลำไยที่แสดงอาการจุดเข็มบนใบ เมื่อส่องกับแสงแดด ซึ่งคาดว่าเป็น latent infection ของเชื้อสาเหตุ นำมาแช่ในสารละลายของ paraquat ความเข้มข้น 0.5% เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างสปอร์ โดยนำใบมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 2% sodium hypochlorite นาน 4 นาทีแล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ในสารละลาย paraquat ความเข้มข้น 0.5% (กาญจนา, 2536 ; Cerkauskas and Sinclair, 1980) ทำเครื่องหมายรอบจุดเข็มบนใบ แล้วนำไปบ่มไว้ใน moist chamber เพื่อทำการบันทึกผลต่อไป

จ. การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ในการทำให้เกิดโรคบนใบลำไย

เตรียม Spore suspension ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ให้มีความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 10^6 spore/ml จากนั้นนำใบอ่อนของต้นกล้าลำไยมาแช่ใน Spore suspension ที่เติม Tween 20 อัตรา 40 μ l ต่อ 100 ml เป็นเวลา 5 นาที แล้วคลุมถุงพลาสติกเพื่อรักษาสภาพความชื้นไว้ 7 วัน ส่วนอีกวิธีการหนึ่งให้เตรียม spore suspension ของเชื้อเช่นเดียวกันแล้วนำไปพ่นลงบนใบของต้นกล้าลำไย แล้วคลุมถุงพลาสติกเพื่อรักษาสภาพความชื้นไว้ 7 วัน แล้วนำใบลำไยจากทั้งสองกรรมวิธี นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 2 % sodium hypochlorite นาน 4 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆละ 1 นาที และใบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิว ทั้งหมดนำมากระตุ้นการสร้างสปอร์ของเชื้อโดยแช่ในสารละลาย paraquat ความเข้มข้น 0.5% เป็นเวลา 4 นาที นำไปบ่มใน moist chamber เพื่อบันทึกผล

ฉ. การแยกสารพิษจากอาการใบจุดดำของลำไยและสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้นในอาหารเหลว

(culture filtrate)

- การสกัดสารพิษจากบริเวณแผลจุดดำบนใบลำไย

ใช้วิธีการสกัดสารพิษที่ดัดแปลงจากวิธีของ Haegi and Porta-Puglia (1995) โดยเก็บใบลำไยที่แสดงอาการใบจุดดำจากสวนลำไย โดยคัดเลือกอาการแผลที่ยังใหม่ สังเกตจากยังมีขอบแผลสีเหลือง และยังไม่แห้งกรอบ (ทำตัวเปรียบเทียบกับ (control) ด้วย คือใช้ใบลำไยปกติ) นำมาล้างน้ำไหล 30 นาทีแล้วตัดบริเวณรอยแผลจุดดำ จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นตัวช่วยทำให้เนื้อเยื่อใบแข็งตัวและกรอบ แล้วผสมด้วย PBS buffer pH ในอัตรา 10:1 v/w ต่อก้อนน้ำหนักสด นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 15 –30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant) ลงในหลอดใหม่แล้วนำไปตกตะกอนใน acetone (ผสมในอัตรา 4 : 1 v/v) แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 คืน เก็บตะกอนที่เกิดขึ้นโดยการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที เก็บ pellet ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทดสอบต่อไป โดยนำไปทำการแยกบนแผ่น thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ developing solvent system คือ ethyl acetate : acetic acid : water = 3:3:1 แล้วนำไปตรวจแถบของสารภายใต้แสง UV

- การสกัดสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นในอาหารเหลว (Toxin extraction from culture filtrate)

ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Amusa (1994) : เลี้ยงเชื้อ *Colletotrichum* sp. บนอาหาร PDA จนเส้นใยเจริญเต็มจานอาหาร แล้วใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มม. ตัดปลายเส้นใยของเชื้อออกเป็นแผ่นกลม แล้วใช้ mycelial disk จำนวน 5 ชิ้นใส่ในอาหารเหลว Richard's medium (Potassium nitrate 10 g, Potassium monobasic phosphate 5 g, Magnesium sulphate 2.5 g, Ferric chloride 0.02 g, Sucrose 50 g, distilled water 1 L) ใน flask ขนาด 250 ml นำไปเข้าเครื่องเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 27°C โดยให้ได้รับแสงสลับกับมืดช่วงละ 12 ชม. เป็นเวลา 28 วัน จากนั้นนำมารองด้วยผ้าขาวบางที่พับ 6 ชั้น เพื่อกรองเอาส่วนของเส้นใยของเชื้อออก เก็บส่วนที่กรองได้ (culture filtrate) นำมาปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 3 ด้วย 10 N HCl นำมาสกัดโดยผสมด้วย ethyl acetate ในอัตราส่วน 1 : 1 ภายใน separating funnel ทิ้งไว้ 48 ชม. เก็บส่วนที่แยกชั้นอยู่ข้างล่างของ funnel นำมาผสม ethyl acetate ทำตามวิธีการเดิมอีก 2 ครั้ง สารสกัดที่ได้นำมาปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7 ด้วย 10 N NaOH แล้วนำไปเข้าเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C เก็บส่วนสกัดหยาบ (crude extract) ที่ได้มาทำการแยกสารบน TLC เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น

- การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดที่ได้จาก Culture filtrate กับพืชทดสอบ

ใช้ต้นกล้าถั่วเขียวอายุ 1 สัปดาห์ ใช้เข็มเย็บที่โคนไฟมาเชื้อแล้วทำแผลบริเวณ epicotyl แล้วเอาสารสกัดซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็นทั้งหมด 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีที่ 1 ใช้สารสกัดที่อยู่ในรูปของผลึกละลายด้วยน้ำกลั่นเจือจางเชื้อแล้วทาบริเวณรอยแผล กรรมวิธีที่ 2 ใช้สารสกัดที่อยู่ในรูปของเหลวหนืด

ละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทาบริเวณรอยแผล และกรรมวิธีที่ 3 เป็นตัวเปรียบเทียบคือทาแผลด้วยด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้ถุงพลาสติกคลุมเพื่อรักษาความชื้น รอบันทึกผล

-ทดสอบการงอกของเมล็ดผักกาดบนแผ่น TLC (Thin Layer Chromatography) โดยหยด (spot) สารสกัดที่เป็นผลึกที่ละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ กับสารสกัดที่เป็นสารหนืดละลายด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อลงบนแผ่น TLC เป็น 2 แถบบนแต่ละแผ่น และทำตัวเปรียบเทียบ โดยหยด Sodium chlorate (NaClO_3) (มีฤทธิ์ยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาด) ลงบนแผ่น TLC และอีกแผ่นหนึ่งหยดอาหาร Richard's medium จากนั้นฉีดพ่นน้ำกลั่นบนแผ่น TLC ให้ชุ่ม แล้วโรยเมล็ดผักกาดที่ผ่านการแช่น้ำไว้ 1 คืนลงบนแผ่น TLC ให้ทั่ว นำไปบ่มไว้ในกล่องเก็บรักษาความชื้น รอบันทึกผล

8.5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคใบจุดดำ โรคคราดำไต้ใบและโรคใบจุดสนิมในสวนลำไย

คัดเลือกสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุในห้วงปฏิบัติการมาแล้ว 5 ชนิดคือ คือ benomyl (Benlate OD), captan (Ortho) , carbendazim (Bavistin) , copper oxychloride (Cupravit) และ benalaxil + mancozeb (Leela-M) มาทำการฉีดพ่นในสวน (โดยทุกกรรมวิธีผสมสารจับใบ Bresmor อัตรา 5 มิลลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร และ สารกำจัดแมลง Sevin อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร) ซึ่งได้ทำการฉีดพ่นในระยะที่ 2 หลังจากเว้นช่วงไปตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2541 ถึงเดือนพฤษภาคม 2541 เนื่องจากเป็นช่วงแล้ง ไม่มีการแพร่ระบาดของโรคใบจุดดำ และได้เริ่มการฉีดพ่นสารเคมีในระยะที่ 2 เริ่มตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2541 เป็นต้นมา เนื่องจากมีฝนตกหนักในบางช่วงของเดือนและสภาพอากาศมีความชื้นเหมาะสมต่อการเกิดโรคทางใบ และเริ่มปรากฏอาการของใบจุดดำ การฉีดพ่นได้ใช้กรรมวิธีการทดลองแบบเดียวกับครั้งแรกโดยใช้อัตราความเข้มข้นของสารเคมีที่แนะนำข้างฉลาก โดยฉีดให้ทั่วทรงพุ่ม โดยเฉพาะบริเวณยอดที่แตกใหม่ที่ยังไม่พบอาการใบจุดดำและอาการอื่น ๆ ซึ่งได้ทำการผูก tag ไว้ต้นละ 5 ซ่อ (1 กรรมวิธีใช้จำนวน 5 ต้น) เพื่อจะได้ติดตามการแสดงอาการของโรคต่อไป ทำการฉีดพ่นทุก 15 วัน

8.5.3 การคัดเลือกเชื้อแอนทาโกนิสต์จากแหล่งต่าง ๆ และการทดสอบเบื้องต้นของเชื้อแอนทาโกนิสต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุใบจุดดำภายในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้เชื้อแอนทาโกนิสต์ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ซึ่งได้แยกจากผิวใบลำไยและวัชพืชในสภาพสวนตามธรรมชาติ และใช้เชื้อแอนทาโกนิสต์ได้แก่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ yeasts ที่ได้รับมาจากงานวิจัยของ ผศ.ดร.จินันทนา จอมดวง จากสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตร จ.ลำปาง ซึ่งได้ทำการศึกษาวินิจฉัยแล้วว่ามีความมีประสิทธิภาพ ในการควบคุมเชื้อรา

แอนแทรกโนสของมะม่วง ได้แก่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 2 ไอโซเลต คือ NFB 7 และ NFB 15 ; เชื้อ yeasts 3 ไอโซเลตคือ Pr1, Pr2 ที่แยกจากผลสาเกก้านยาว, Ciku1 แยกจากผลละมุดมาเลย์ และ Mg 1 แยกจากผลมะเกี๋ยง ; เชื้อที่ทำการแยกจากแหล่งต่าง ๆ คือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่แยกจากผิวใบลำไยจำนวน 1 ไอโซเลต คือ B4 และเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากวัชพืชในสวนลำไยคือหญ้าข้าวฉ่ำจำนวน 3 ไอโซเลตคือ G1, G2 และ G3 ; เชื้อแบคทีเรียที่ได้รับมาจากโครงการ ABS/TRF ของมหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* จำนวน 2 ไอโซเลตคือ ABS042 และ MK007 ; เชื้อราแอนทาโกนิสต์ที่ใช้ควบคุมโรคในแปลงถั่วได้แก่ *Gliocladium virens* จำนวน 1 ไอโซเลตและเชื้อรา *Trichoderma harzianum* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ Tricho1 และ Tricho2 โดยเชื้อที่คัดเลือกไว้รวมจำนวนทั้งสิ้น 15 ไอโซเลต นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp., แบบ dual culture โดยวางชิ้นวุ้นของเชื้อรา (เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นแล้วตัดด้วย Cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร) นำมาวางตามแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของผิวหน้าอาหาร PDA บนจานเลี้ยงเชื้อ ให้ห่างจากขอบจานเข้ามา 2 เซนติเมตร เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้เร็วกว่าจึงต้องวางเชื้อราก่อน แล้วปล่อยให้เชื้อราเจริญจนมีเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 2 –3 เซนติเมตร (ประมาณ 3 วัน) แล้วใช้ loop และเชื้อแบคทีเรียหรือ yeasts ที่ต้องการทดสอบ จิกเป็นเส้นตรงลงด้านตรงข้ามโคโลนีของเชื้อราห่างประมาณ 5 เซนติเมตร โดยทำทั้งหมด 5 ซ้ำต่อเชื้อทดสอบ บ่มเชื้อไว้จนกระทั่งโคโลนีของเชื้อราและแบคทีเรียเจริญมาชนกัน บันทึกผลโดยการวัดความยาวรัศมีของเชื้อราในงานทดสอบและในงานที่ไม่ปลูกเชื้อทดสอบซึ่งใช้เป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) นำมาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth – PIRG) โดยมีสูตรในการคำนวณดังนี้

$$PIRG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100\%$$

R_1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อ *Colletotrichum* sp. ในงาน control

R_2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อ *Colletotrichum* sp. ในงาน ทดสอบ

8.5.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอนทาโกนิสต์ชนิดต่างๆในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Colletotrichum sp. ที่แยกได้จากใบลำไยบน leaf disc

นำใบลำไยตัดเป็นวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร (Cork borer เบอร์ 6) แล้วนำ leaf disc ที่ได้ จุ่มในน้ำเดือดใช้เวลานาน 30 วินาที แล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยของสปอร์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร MYA (Malt Yeast Extract Agar) 3 วัน ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้เพิ่มปริมาณสปอร์ให้ได้ในปริมาณมากในการทดลองแบ่งเป็น 2 ชุด คือ จุ่มใบลงในสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่มีความเข้มข้น 10^6 spore/ml บ่มไว้ในกล่องพลาสติกที่ใส่กระดาษกรองขึ้นทั้งบนฝากล่องและตัวกล่อง โดยวางหงายหลังใบขึ้นบนตะแกรง ปิดฝาให้สนิทในอุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว จึงปลูก

เชื้อ Antagonist (ในกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้ความเข้มข้น 6×10^6 cfu/ml และในกลุ่มของยีสต์ใช้ความเข้มข้น 1×10^6 cfu/ml ทำ 10 ซ้ำ) และทำการทดลองอีกชุด โดยทำการปลูกเชื้อสลับกัน คือจุ่มใบในเชื้อ Antagonist ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. จากนั้นนำไปบ่มไว้ 7 วัน จึงทำการตรวจผลการทดลองโดยนับจำนวนกลุ่มสปอร์สีส้มภายใต้กล้องสเตอริโอ (stereomicroscope) ที่เกิดบนหลังใบลำไย และใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร นับจำนวนสปอร์ด้วย Haemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) บันทึกผลการทดลอง

ผลการทดลอง

8.5.1 การพิสูจน์เชื้อสาเหตุของโรคใบจุดดำ

ก. การแยกเชื้อราจากอาการใบจุดดำของลำไย

จากการตรวจสอบแผลจุดดำของใบลำไยที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ลักษณะของแผลส่วนใหญ่เป็นจุดแผลสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ค่อนข้างกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 0.5 ซม. บางจุดแผลอาจต่อกันทำให้เกิดแผลขนาดใหญ่ขึ้น เนื้อเยื่อภายในบริเวณแผลแห้งกรอบเป็นสีดำ และบริเวณขอบแผลซีด ตัดกับบริเวณเนื้อเยื่อใบที่ปรกติอย่างเห็นได้ชัด บางครั้งพบกลุ่มของสปอร์สีเทาขึ้นอยู่บริเวณแผลที่ได้ใบหรือหลังใบ (Figure 110)

จากการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโดยวิธี free-hand section แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเชื้อรามากกว่า 1 ชนิด บางชนิดสร้าง acervulus ขึ้นที่ผิวใบ สำหรับเชื้อราที่ขึ้นบริเวณแผลจุดดำได้ใบพบว่า มีลักษณะสปอร์เป็นเซลล์เดี่ยวลักษณะโค้งงอมีสีน้ำตาลเข้ม สร้าง conidiophore สั้น ๆ มีลักษณะตรงกับเชื้อ *Zygosporium* sp. (Figure 111) คาดว่าเป็นเชื้อที่เข้าทำลายภายหลังที่เกิดแผลจุดแล้ว โดยจะพบเชื้อนี้มากจากตัวอย่างใบลำไยที่เก็บจากสภาพความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศค่อนข้างสูง

สำหรับเชื้อราที่แยกได้จากแผลบนอาหาร PDA พบว่าหลังจากบ่มเชื้อนาน 3 – 5 วันพบเส้นใยของเชื้อราหลายชนิดเจริญออกมาจากชั้นพีช เมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยนำเส้นใยแต่ละชนิดมาเลี้ยงบนอาหาร PDA สามารถจำแนกชนิดจากลักษณะของสปอร์และเส้นใยพบว่าสามารถจำแนกได้เป็นเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Helminthosporium* sp., *Phomopsis* sp. และ *Zygosporium* sp. เชื้อที่แยกได้เหล่านี้เก็บไว้เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับใบลำไยต่อไป

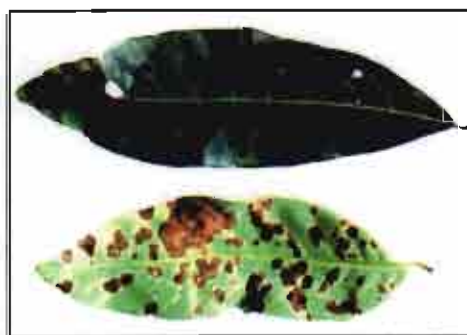


Figure 110. Black spot symptom on upper and lower of longan leaf.



Figure 111. Conidia and conidiophore of *Zygosporium* sp. on black spot symptom of longan leaf (secondary infection).

ข. การพิสูจน์ความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนใบลำไยของเชื้อราที่แยกได้

- ผลการทดสอบการปลูกเชื้อลงบนใบลำไยแบบวิธีDLT

พบว่าแบบทำแผลบนใบอ่อน เชื้อราทดสอบทุกชนิดสามารถทำให้เกิดแผลได้แต่มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันทั้งหน้าใบและใต้ใบ ส่วนกรรมวิธีที่ไม่ทำแผลบนใบอ่อนพบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สามารถทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลดำแผ่ขยายออกไปรอบขึ้นวันในรัศมีที่กว้าง รูปร่างแผลไม่แน่นอน มีการสร้างกลุ่มสปอร์สีส้มกระจายทั่วบริเวณแผลทั้งหน้าใบ และใต้ใบ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Helminthosporium* sp. ก็สามารถทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลดำได้เช่นกันแต่มีขนาดเล็ก

สำหรับกรรมวิธีที่ทดสอบกับใบแก่ทั้งแบบทำแผลและไม่ทำแผล เชื้อราทดสอบทุกชนิดไม่ทำให้เกิดอาการบนใบแก่ (Figure 112) (Table 108)



Figure 112. Pathogenicity test on detached longan leaves of various fungi isolated from black spot symptom.

- ผลการทดสอบการปลูกเชื้อลงบนต้นกล่ำลำไย

หลังปลูกเชื้อ 2 สัปดาห์ พบว่าเชื้อ *Colletotrichum* sp. เป็นเชื้อที่สามารถทำให้ลำไยเกิดแผลรุนแรงเมื่อปลูกเชื้อร่วมกับเชื้อชนิดอื่น ๆ และเชื้อ *Helminthosporium* sp. ก็สามารถทำให้เกิดแผลได้เช่นกันแต่มีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Colletotrichum* sp. (Table 109)

ค. ผลการแช่ใบปรกติและใบที่เป็นโรคจุดดำในสารละลายของ paraquat

แช่ใบที่ความเข้มข้น 0.3% และ 0.5% เป็นเวลาต่าง ๆ แล้วบ่มไว้ใน moist chamber เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ใบที่มีอาการจุดดำที่แช่ในสารละลายของ paraquat ความเข้มข้น 0.3% และ 0.5% นาน 1 และ 2 นาที มีเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum* sp. เจริญบนใบเล็กน้อยและมีการสร้างสปอร์น้อยมาก ในขณะที่ใบที่จุ่มในสารละลายของ paraquat ความเข้มข้น 0.5% นาน 4 นาทีจะพบเส้นใยและกลุ่มของสปอร์จำนวนมาก ซึ่งมีสีส้มปรากฏชัดเจนตามอาการจุดแผลบนใบ ส่วนใบปรกติในทุกกรรมวิธีไม่พบสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. (Figure 113) (Table 110)



Figure 113. White mycelia and spore mass produced on black spot symptom after leaf treatment with 0.5% paraquat.

Table 108. Disease development on detached young leaves after inoculating with fungi isolates from longan black spot

Treatment	Disease development on detached young leaves			
	Upper leaf		Lower leaf	
	Wounded	Unwounded	Wounded	Unwounded
<i>Colletotrichum</i> sp.	+++	++	+++	++
<i>Helminthosporium</i> sp.	++	+	++	+
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	+	-	+	-
<i>Phomopsis</i> sp.	+	-	-	-
<i>Zygosporium</i> sp.	-	-	+	-

- = no lesion.

+ = small lesion around inoculation point.

++ = necrosis around inoculation point .

+++ = severe symptom.

Table 109. Disease development on longan seedlings after combine inoculating with mycelial disc of fungi isolates from longan black spot

Treatment	Disease development
<i>Colletotrichum</i> sp. + <i>Pestalotiopsis</i> sp.	necrosis around mycelial disc: severe symptom
<i>Colletotrichum</i> sp. + <i>Phomopsis</i> sp.	necrosis around mycelial disc: severe symptom
<i>Colletotrichum</i> sp. + <i>Helminthosporium</i> sp.	necrosis around mycelial disc: severe symptom
<i>Colletotrichum</i> sp. + <i>Zygosporium</i> sp.	necrosis around mycelial disc: severe symptom
<i>Pestalotiopsis</i> sp. + <i>Phomopsis</i> sp.	No symptom
<i>Pestalotiopsis</i> sp. + <i>Helminthosporium</i> sp.	Small lesions develop around mycelial disc
<i>Pestalotiopsis</i> sp. + <i>Zygosporium</i> sp.	No symptom
<i>Phomopsis</i> sp. + <i>Helminthosporium</i> sp.	Small lesions develop around mycelial disc
<i>Phomopsis</i> sp. + <i>Zygosporium</i> sp.	No symptom
<i>Zygosporium</i> sp. + <i>Helminthosporium</i> sp.	Small lesions develop around mycelial disc

Table 110. The mycelium and spore mass of *Colletotrichum* sp. were detected after treated with 0.3% and 0.5% paraquat for various times and incubated in moist chamber for 5 days

Treatment	Mycelium / Spore mass of <i>Colletotrichum</i> sp. were detected on lesions :					
	1 min.		2 min.		4 min.	
	Mycelium	Spore	Mycelium	Spore	Mycelium	Spore
Normal leaf + 0.3% paraquat	-	-	-	-	-	-
Normal leaf + 0.5% paraquat	-	-	-	-	-	-
Normal leaf + distilled water	-	-	-	-	-	-
Diseased leaf + distilled water	+	-	+	-	+	-
Diseased leaf + 0.3% paraquat	+	-	++	+	++	++
Diseased leaf + 0.5% paraquat	++	-	++	++	+++	+++

- = no mycelium / spore was produced.

+ = 1% - 34% of lesions produced mycelium/ spore.

++ = 35% - 75% of lesions produced mycelium/ spore.

+++ = >75% of lesions produced mycelium/ spore.

ง. ผลการกระตุ้นแผลที่เป็น *latent infection* ด้วยสารละลายของ *paraquat* ความเข้มข้น 0.5% พบว่าหลังการบ่มไว้ 3 วัน มีเส้นใยสีขาวปนเทาและกลุ่มสปอร์สีส้มของเชื้อรา ขึ้นบริเวณใบที่ทำเครื่องหมายไว้ (Figure 114) เมื่อนำเส้นใยนี้นำเลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่าลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นเชื้อ *Colletotrichum* sp. ซึ่งมีการสร้างกลุ่มของสปอร์สีส้มบนอาหาร PDA

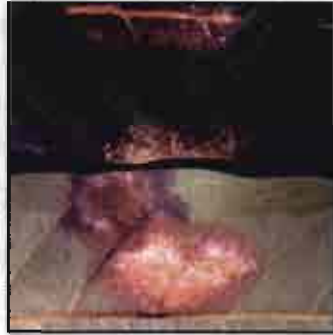


Figure 114. Growth of mycelia and spore mass of *Colletotrichum* sp. on latent infection lesions of longan leaf after treatment with 0.5% paraquat.

จ. ผลของการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

ในกรณีของใบอ่อนที่แช่ใน spore suspension ของเชื้อทดสอบแล้วบ่มไว้ 7 วัน จากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย *paraquat* 0.5% เมื่อบ่มไว้อีก 5 วันพบว่าใบที่ฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนแช่ใน *paraquat* มีเส้นใยสีขาวปนเทาขึ้นปกคลุมกระจายหนาแน่นทั่วทั้งใบและมีการสร้างกลุ่มของสปอร์สีส้ม (spore mass) ปรากฏทั่วทั้งใบ สำหรับใบที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก็พบเส้นใยสีขาวปนเทาพร้อมทั้งกลุ่มของสปอร์สีส้มซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ปรากฏอยู่กระจายทั่วไปปนกันกับเส้นใยของเชื้อราชนิดอื่นๆ เช่น *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. เป็นต้น สำหรับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อแบบฉีดพ่นบนใบของต้นกล้าลำไย พบว่าทั้งใบที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อที่ผิวเมื่อผ่านการแช่ในสารละลาย *paraquat* เมื่อบ่มไว้ 5 วันมีกลุ่มของสปอร์สีส้มขึ้นอยู่ที่บริเวณแผลที่เกิดจากการปลูกเชื้อเป็นจำนวนมาก ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อที่ยังปรกติอยู่มีกลุ่มของสปอร์สีส้มขึ้นอยู่บ้างเล็กน้อยและมีเส้นใยสีขาวปนเทาขึ้นปกคลุมบาง ๆ ทั่วทั้งใบ (Figure 115)

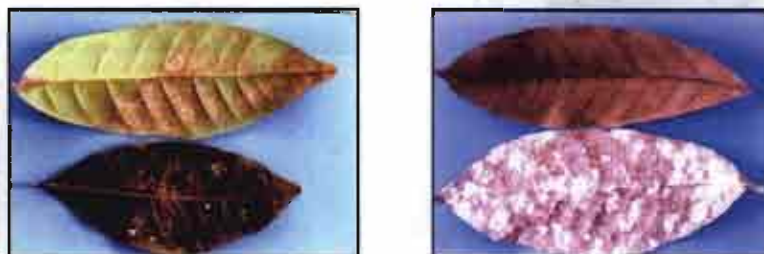


Figure 115. Mycelia and spore mass of *Colletotrichum* sp. produced on inoculated longan leaves which were treated with 0.5% paraquat and incubation for 5 days in moist chamber. (Left : surface sterilized before treatment , Right : non – surface sterilized).

ฉ. ผลการศึกษาสารพิษที่สกัดจากอาการใบจุดดำและจาก *Culture filtrate*

- ผลการศึกษาสารพิษที่สกัดจากอาการใบจุดดำ

พบว่าสารที่สกัดได้จากบริเวณแผลของใบจุดดำเป็นของเหลวสีออกเหลืองที่มีลักษณะเหนียวข้น

- ผลการศึกษาสารพิษจาก *culture filtrate* โดยทำการสกัดจากอาหารเหลว

พบว่ามีความเป็นของเหลวสีออกเหลืองที่มีลักษณะเหนียวข้นเช่นกันรวมทั้งเกิดเป็นผลึก สามารถละลายน้ำได้

เมื่อนำสารสกัดที่ได้จากทั้ง 2 วิธีการ มาทำการแยกสารบนแผ่น TLC แล้วนำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่นแสง 254 และ 366 nm พบแถบที่สามารถเรืองแสง UV แต่ไม่สามารถแยกออกเป็นแถบ (band) ชัดเจน มีลักษณะคล้ายกับเป็น polymer จึงไม่สามารถแยกออกเป็นแถบ ๆ ได้

- ผลการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ

สารสกัดทั้งจากแผลจุดดำและ *Culture filtrate* สามารถทำให้เกิดจุดแผลขนาดเล็กสีน้ำตาลแดงบริเวณใบอ่อนที่งอกออกมาใหม่ของต้นกล้าถั่วเขียวและพบอาการขอบใบไหม้สีน้ำตาลบนใบที่เจริญเต็มที่แล้ว หลังจาก inoculate บริเวณ epicotyl เป็นเวลา 4 วัน (Figure 116)

- ผลการทดสอบการยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดบนแผ่น TLC

แผ่น TLC ที่หยดด้วยสารสกัดทั้งจากแผลจุดดำและ *Culture filtrate* สามารถยับยั้งการงอกของเมล็ดผักกาดได้ โดยดูจากเมล็ดผักกาดที่อยู่ในแถบที่มีสารสกัดอยู่จะไม่งอกรวมทั้งแผ่นที่หยด NaClO_3 ด้วย ส่วนแผ่นที่หยดด้วยอาหาร Richard's medium เมล็ดผักกาดที่เพาะไว้จะงอกเต็มแผ่น (Figure 117)



Figure 116. Leaf spot and blight symptom developed on young and mature leaf of mungbean seedling after inoculation with crude extract of black spot leaf and culture filtrate of *Colletotrichum* sp.



Figure 117. Germination test of lettuce seeds on TLC

Spotted with : (from left to right)

1. crude extract
2. culture filtrate
3. NaClO_3
4. Richard's medium

8.5.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดดำในสวนลำไย

ผลการฉีดสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราทุก 15 วันในระยะที่ 2 หลังจากเริ่มปรากฏอาการใบจุดดำรวม 4 ครั้งคือครั้งที่ 1 วันที่ 2 มิถุนายน 2541 ครั้งที่ 2 วันที่ 16 มิถุนายน 2541 ครั้งที่ 3 วันที่ 14 กรกฎาคม 2541 และครั้งที่ 4 วันที่ 28 กรกฎาคม พ.ศ.2541 พบว่าเมื่อคิดค่าเฉลี่ยของการเกิดโรคในแต่ละกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา ในทุกกรรมวิธีสามารถลดอัตราการเกิดแผลจุดดำได้ดีกว่าคือ disease severity rating อยู่ในระดับไม่เกิน 1 ในขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบ(control) ยังคงพบแผลจุดดำบนใบเฉลี่ยเท่ากับ 2.68 (Table 111) คือมีแผลจุด 21-40%ของพื้นที่ใบ ซึ่งถือว่าการระบาดของโรคใบจุดดำในช่วงระยะเวลาของการทดลองนี้ยังอยู่ในระดับปานกลาง และบริเวณที่ทำการสุก lag ไว้ในทุกกรรมวิธีไม่พบอาการของราดำและจุดสนิมเลย

Table 111. Disease severity rating of black spot disease of longan leaves after spraying with various fungicides for 4 times at 15 days interval

Treatment	Disease severity of black spot					Average	
	Shoot No.					Shoot	Tree
	1	2	3	4	5		
Control 1	2	2	1	1	0	1.2	2.68
Control 2	2	4	2	4	4	3.2	
Control 3	4	2	4	2	2	2.8	
Control 4	3	3	2	3	1	2.4	
Control 5	3	4	4	4	4	3.8	
Bavistin 1	1	1	1	0	0	0.6	0.28
Bavistin 2	1	1	0	0	0	0.4	
Bavistin 3	0	0	0	0	0	0	
Bavistin 4	0	0	0	0	1	0.2	
Bavistin 5	1	0	0	0	0	0.2	
Leela-M 1	0	0	0	1	0	0.2	0.12
Leela-M 2	0	0	0	0	0	0	
Leela-M 3	0	0	0	0	0	0	
Leela-M 4	0	0	0	0	0	0	
Leela-M 5	1	1	0	0	0	0.4	
Benlate OD 1	0	0	0	0	0	0	0.28
Benlate OD 2	0	0	0	0	1	0.2	
Benlate OD 3	1	0	0	0	1	0.4	
Benlate OD 4	1	1	0	1	1	0.8	
Benlate OD 5	0	0	0	0	0	0	
Cupravit 1	0	0	0	0	0	0	0.08
Cupravit 2	0	0	1	0	1	0.4	
Cupravit 3	0	0	0	0	0	0	
Cupravit 4	0	0	0	0	0	0	
Cupravit 5	0	0	0	0	0	0	
Orthocide 1	0	0	1	0	0	0.2	0.16
Orthocide 2	0	0	0	0	0	0	
Orthocide 3	0	1	0	0	0	0.2	
Orthocide 4	0	0	0	0	0	0	
Orthocide 5	1	0	1	0	0	0.4	

Disease severity rating : 0 = no disease symptom

1 = 1 – 20% of lesions develop on leaf area.

2 = 21 – 40% of lesions develop on leaf area.

3 = 41 – 60% of lesions develop on leaf area.

4 = 61 – 80% of lesions develop on leaf area.

5 = > 81% of lesions develop on leaf area.

สำหรับการดำเนินการในขั้นตอนต่อไปเป็นการติดตามผลของการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรากับโรคใบจุดดำ เพราะช่วงฤดูกลมีผลต่อการแพร่ระบาดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูฝน การแพร่ระบาดของโรคใบจุดดำจะเกิดรุนแรง และได้ทำการติดตามผลของการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรากับโรคราดำได้ ใบและจุดสาหร่ายสนิมในสภาพสวนทดลองเดียวกันนี้ด้วย โดยในช่วงตั้งแต่เดือนตุลาคม 2541 เป็นต้นมา ไม่พบการแพร่ระบาดของโรคใบจุดดำในส่วนลำไยที่ทำการทดลอง เนื่องจากสภาพภูมิอากาศในช่วงดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุ เพราะมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศค่อนข้างต่ำ และเริ่มเข้าสู่ฤดูหนาว จึงไม่ได้มีการกำหนดแผนการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในขณะนี้ แต่ยังคงติดตามผลระดับการเกิดโรคใบจุดดำตามข้อลำไยที่ทำเครื่องหมายไว้ในกรรมวิธีต่าง ๆ คือกรรมวิธีที่ฉีดพ่น benomyl (Benlate OD), captan (Ortho), carbendazim (Bavistin), copper oxychloride (Cupravit) และ benalaxil + mancozeb (Leela-M) รวมกรรมวิธีเปรียบเทียบ ทั้งหมด 6 กรรมวิธี โดยติดตามการแสดงอาการของโรคทุกเดือนจนกระทั่งถึงเดือนมกราคม 2542 ซึ่งหลังจากหยุดการฉีดสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราทุก 15 วันในระยะที่ 2 (ครั้งสุดท้ายเมื่อ 28 กรกฎาคม พ.ศ. 2541) และได้ทำการติดตามผลการเกิดโรคใบจุดดำ ราดำและใบจุดสนิม ในแต่ละกรรมวิธีทุกเดือนจนกระทั่งถึงเดือนมกราคม 2542 ยังไม่พบว่ามีอาการเกิดแผลจุดดำรวมทั้งราดำได้ใบและจุดสาหร่ายสนิมในข้อที่ทำเครื่องหมายไว้ในทุกกรรมวิธีที่ฉีดพ่นสารเคมี รวมทั้งกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) แต่ยังคงพบแผลจุดดำ อาการของราดำได้ใบ และใบจุดสาหร่ายสนิมบนใบแก่ในทรงพุ่มที่ไม่ได้รับแสงแดดโดยตรงบ้าง ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่ได้ผูก Tag ไว้ คือมีแผลจุดเฉลี่ยไม่เกิน 20% ของพื้นที่ใบ ซึ่งไม่ถือว่ามีอาการระบาดของโรคใบจุดดำในช่วงระยะเวลาดังกล่าว และใบแก่เหล่านี้ก็เริ่มที่จะหลุดร่วง ลักษณะของแผลที่เกิดขึ้นเป็นร่องรอยแผลเก่าที่เริ่มแห้งกรอบ แสดงให้เห็นว่าผลจากการฉีดพ่นสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราอย่างต่อเนื่องทุก 15 วันหรือประมาณ 2 สัปดาห์ ในช่วงฤดูฝนที่มีการระบาดของโรคนี้ สามารถยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคใบจุดดำ ราดำได้ใบและใบจุดสนิมได้ สามารถแนะนำให้เกษตรกรผู้ปลูกลำไยที่พบปัญหาโรคเหล่านี้ให้เลือกใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราในกลุ่มของ benomyl, captan, carbendazim, copper oxychloride และ mancozeb ตัวใดตัวหนึ่งหรือเลือกมากกว่าหนึ่ง เพื่อฉีดพ่นสลับกันทุก 2 สัปดาห์ในช่วงที่มีการระบาดของโรคและช่วงที่มีฝนตกความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง ก็จะเป็นการแก้ปัญหาการแพร่ระบาดของโรคเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

8.5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ antagonist ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคใบจุดดำ

ผลการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากอาการใบจุดดำของลำไยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่า percent inhibition of radial growth ที่ได้จากการยับยั้งโดยเชื้อ antagonist มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ โดยกลุ่มของแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ ได้แก่ เชื้อ B4 ให้ค่าเปอร์เซนต์การยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 26.32 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ เชื้อ NFB15 มีค่าเท่ากับ 25.10 เปอร์เซนต์ ส่วนในกลุ่มของยีสต์มีเชื้อ MGI ที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ในปฏิกิริยาการ

ยับยั้งพบว่าเกิดช่องใส (clear zone) ระหว่างเชื้อ *Colletotrichum* sp. กับเชื้อ antagonist ขึ้นเกือบทุกการทดลอง ยกเว้นเชื้อ G3 และ MG1 ไม่เกิด clear zone และลักษณะเส้นใยของเชื้อ *Colletotrichum* sp. เกิดการยุบตัวบริเวณที่ใกล้กับเชื้อ antagonist และในกลุ่มของเชื้อราแอนทาโกนิสต์ พบว่า ผลในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างเชื้อราทั้ง 3 ชนิด แต่ให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ antagonist สองกลุ่มแรก ซึ่งพบว่าเชื้อ Trichol (*Trichoderma* sp.) สามารถยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเชื้อ Glio (*Gliocladium virens*) โดยจะสังเกตเห็นว่าเชื้อสามารถเจริญปกคลุมเชื้อ *Colletotrichum* sp. จนทำให้เชื้อ *Colletotrichum* sp. ไม่สามารถเจริญได้ (Figure 118) (Table 112)



Figure 118. Antagonistic activity test of different microorganisms to suppress the mycelial growth of *Colletotrichum* sp. on PDA.

Table 112. Percent inhibition of radial growth of *Colletotrichum* sp. by various antagonistic microorganisms

Antagonists	Percent inhibition of radial growth of <i>Colletotrichum</i> sp. (PIRG) ^a
Bacteria :	
G1	17.00 cd ¹
G2	11.74 de
G3	10.93 e
B4	26.32 b
NFB7	18.22 c
NFB15	25.10 b
ABS042	9.61 e
MK007	14.85 cde
Yeasts :	
MG1	0.00 f
Ciku	12.15 de
Pr1	12.15 de
Pr2	11.74 de
Fungi :	
<i>Trichoderma</i> sp.	94.79 a
<i>Trichoderma harzianum</i>	91.86 a
<i>Gliocladium virens</i>	91.90 a

¹ Numbers within columns not followed by the same letter differ significantly.

8.5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ antagonist ชนิดต่างๆบน leaf disk ในการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่แยกได้จากใบตำไอย

จากการทดลอง การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ antagonist 3 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. ก่อน 24 ชั่วโมง แล้วปลูกเชื้อ

antagonist และกลุ่มที่ 2 ทำการปลูกเชื้อ antagonist ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วปลูกเชื้อก่อโรค พบว่าเชื้อแบคทีเรียได้แก่ เชื้อ ABS042 สามารถลดปริมาณการสร้างสปอร์ได้ผลดีที่สุดทั้งในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2

เชื้อ antagonist ที่เป็นยีสต์ พบว่ากลุ่มการทดลองที่ 1 จะมี Ciku ที่ให้ผลในการลดปริมาณการสร้างสปอร์ได้ดี และในกลุ่มการทดลองที่ 2 คือ Pr1 และเชื้อรา antagonist ที่สามารถลดปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อสาเหตุของโรค *Colletotrichum* sp. ได้ผลดีที่สุด ในกลุ่มการทดลองที่ 1 คือเชื้อ *Trichoderma* sp. และกลุ่มการทดลองที่ 2 คือเชื้อ *G. virens* สรุปโดยรวมจะเห็นว่าในกลุ่มการทดลองที่ 2 (การปลูกเชื้อ antagonist ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp.) จะสามารถลดปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ได้ดีกว่ากลุ่มการทดลองที่ 1 (ทำการปลูกเชื้อ *Colletotrichum* sp. ก่อน 24 ชั่วโมงแล้วปลูกเชื้อ antagonist) รวมถึงการควบคุมการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum* sp. ด้วยเชื้อ antagonist ทั้ง 3 ชนิดจะพบว่าเชื้อราให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่นๆ ซึ่งผลจากค่าของข้อมูล (Table 113, 114 and 115) เป็นข้อมูลที่วิเคราะห์ทางสถิติตามวิธี split-plot design โดยข้อมูลที่ได้เป็นจำนวนเต็มที่มีความแตกต่างกันอย่างมากหรือข้อมูลชุดนี้มีการแจกแจงของข้อมูลเป็นไปอย่างไม่เป็นปกติ จึงทำการแปลงข้อมูลตามวิธี log ซึ่งมีเวลาของการปลูกเชื้อเป็น main plot และ antagonist isolate เป็น sub plot ซึ่งวิธีการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูล จำนวนได้ดังนี้

นำค่าในวงเล็บจากข้อมูลในตารางมาลบกัน เมื่อได้ค่าความแตกต่างแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับค่า LSD ($P=0.05$) และ LSD ($P=0.01$) ซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างน้อยกว่าค่า LSD ($P=0.05$) จะสรุปได้ว่า ข้อมูลที่เปรียบเทียบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หากค่าที่ได้มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ ($\geq$) LSD ($P=0.05$) หรือ LSD ($P=0.01$) จะถือว่าข้อมูลที่เปรียบเทียบกันนั้น มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หรือที่ความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ตัวอย่างการคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างของแบคทีเรีย 2 isolates ระหว่าง G3 มีค่าเท่ากับ 2.44 และ NFB7 2.61 ในกลุ่มที่ 1 [LSD ($P=0.05$) = 0.21 และ LSD ($P=0.01$) = 3.7] พบว่าค่าที่ได้มีความแตกต่างกันเท่ากับ 0.17 มีค่าน้อยกว่า LSD ($P=0.05$) จึงสรุปได้ว่า ทั้งสองเชื้อนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเวลาของการปลูกเชื้อของเชื้อ NFB15 พบว่า ค่าได้เท่ากับ 0.25 ซึ่งมีค่ามากกว่า LSD ($P=0.05$) สรุปได้ว่าเวลาก่อนและหลังปลูกเชื้อก่อโรคของ NFB15 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

เชื้อแอนทาโกนิสต์ในกลุ่มที่เป็นเชื้อราคือเชื้อ *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้ดีที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่เป็นแบคทีเรีย โดยที่ B4 และ NFB15 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้ดีที่สุดในกลุ่มที่เป็นเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. ได้ค่อนข้างต่ำสุดจากกลุ่มเชื้อแอนทาโกนิสต์ที่นำมาทดสอบ

Table 113. Efficiency of antagonistic bacteria to suppress the growth of *Colletotrichum* sp. on leaf disc

Bacteria	number of spores of <i>Colletotrichum</i> sp. ($\times 10^5$ spores/ml) were detected on leaf disc	
	Treatment 1	Treatment 2
	pre-inoculate with <i>Colletotrichum</i> sp.	pre-inoculate with antagonistic bacteria
G1	313.50 ^x (2.49) ^y	95.00 (1.95)
G2	371.50 (2.57)	299.50 (2.48)
G3	273.50 (2.44)	141.50 (2.15)
B4	364.00 (2.56)	140.50 (2.15)
NFB7	410.50 (2.61)	380.00 (2.58)
NFB15	397.00 (2.60)	173.00 (2.34)
ABS042	213.50 (2.33)	72.50 (1.86)
MK007	352.50 (2.55)	201.50 (2.30)

^x means from 2 replications.

^y log transformation .

$LSD_{0.05} = 0.21$ $LSD_{0.01} = 0.37$.

Table 114 Efficiency of antagonistic yeast to suppress the growth of *Colletotrichum* sp. on leaf disc

Yeast	number of spores of <i>Colletotrichum</i> sp. ($\times 10^5$ spores/ml) were detected on leaf disc	
	Treatment 1	Treatment 2
	pre-inoculate with <i>Colletotrichum</i> sp.	pre-inoculate with antagonistic yeasts
MG1	286.00 ^x (2.45) ^y	250.00 (2.40)
Ciku	195.00 (2.29)	115.50 (2.05)
Pr1	289.50 (2.46)	45.50 (1.62)
Pr2	275.50 (2.44)	55.00 (1.73)

^x means from 2 replications.

^y log transformation.

log transformation LSD .

$LSD_{0.05} = 0.20$, $LSD_{0.01} = 0.30$.

Table 115. Efficiency of antagonistic fungi to suppress the growth of *Colletotrichum* sp. on leaf disc

Fungi	number of spores of <i>Colletotrichum</i> sp. ($\times 10^5$ spores/ml) were detected on leaf disc	
	Treatment 1	Treatment 2
	pre-inoculate with <i>Colletotrichum</i> sp.	pre-inoculate with antagonistic fungi
Tricho1	201.50 ^x (2.30) ^y	77.50 (1.89)
Tricho2	260.50 (2.40)	53.00 (1.70)
G. virens	227.50 (2.36)	45.50 (1.66)
Control	503.50 (2.70)	243.50 (2.38)

^x means from 2 replications.

^y log transformation.

$$LSD_{0.05} = 0.32 \quad LSD_{0.01} = 0.58.$$

[LSD สำหรับเปรียบเทียบ interaction ระหว่าง main plot กับ sub plot].

สรุปผลการทดลอง

เชื้อราที่แยกได้จากแผลจุดดำจากแหล่งต่างๆ สามารถตรวจพบเชื้อราได้หลายชนิด เช่น

Colletotrichum sp., *Pestalotiopsis* sp., *Helminthosporium* sp., *Phomopsis* sp. และ *Zygosporium* sp. ทำให้เกิดความสับสนในเรื่องของเชื้อสาเหตุที่แท้จริง แต่พบว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เป็นเชื้อที่ตรวจพบความถี่มากที่สุดกล่าวคือสามารถแยกได้มากที่สุดจากอาการจุดดำบนใบลำไยที่เก็บมาจากแหล่งต่างๆ แสดงให้เห็นว่าเชื่อนี้น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญของการทำให้เกิดโรค โดยทำให้เกิดอาการร่วมกับเชื้อราชนิดอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเรื่องของความสามารถในการทำให้เกิดโรคโดยการปลูกเชื้อราที่แยกจากอาการจุดดำของลำไยแบบร่วมกันและเป็นผลทำให้เกิดแผลที่รุนแรง เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ถูกจัดว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มของ endophyte และมักไม่แสดงอาการปรากฏออกมาให้เห็นในระหว่างช่วงที่เพาะปลูก เช่นที่พบในถั่วเหลืองและวัชพืชหลายชนิด จนกระทั่งปลายฤดูการหรือระยะเก็บเกี่ยวก็จะปรากฏว่ามีการสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรา (fruiting body) เช่น acervuli ออกมาให้เห็นในส่วนของพืชที่อยู่ในระยะ senescence หรือส่วนของพืชที่ตายแล้ว (Hartman et al, 1986) สำหรับกรณีของอาการใบจุดดำของลำไย ก็สามารถอธิบายการเกิดแผลจุดดำได้เช่นกัน เนื่องจากในต้นลำไยต้นเดียวกัน แผลจุดดำจะปรากฏเฉพาะชุดของใบแก่เท่านั้น ในขณะที่ใบอ่อนเพิ่งแตกออกมาใหม่จะไม่ปรากฏอาการของใบจุดดำเลย แต่อาจจะพบร่องรอยจุดเข็มในเนื้อใบเมื่อส่องกับแสงแดดกับใบที่มีอายุกลางๆ ซึ่งเมื่อใบแก่เกิดอาการแผลจุดดำแล้วก็มีโอกาสที่ถูกเชื้อราชนิดอื่นเข้าทำลายซ้ำเติม จะเห็นได้จากลักษณะแผลบนใบของลำไยแต่ละสวนก็จะมีขนาดไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย โดยปกติแล้วบนผิวใบลำไยก็พบว่ามีเชื้อราในกลุ่ม epiphytes เจริญอยู่เป็นจำนวนมาก (ปริญาและคณะ, 2538) เมื่อเชื้อ *Colletotrichum* sp. ที่เป็นเชื้อราสาเหตุทำให้เกิดอาการปรากฏบนใบในระยะใบแก่ ก็เป็นโอกาสที่เชื้อราบนผิวใบเหล่านี้เข้าทำลายซ้ำเติม ถ้าหากสภาพแวดล้อมเหมาะสมเช่นมีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูง บางครั้งก็จะปรากฏเส้นใยของเชื้อราที่เข้าทำลายระยะหลังบนแผลจุดดำเช่นเชื้อรา *Zygosporium* sp. พบว่าเจริญอยู่บริเวณแผลจุดดำในส่วนใต้ใบหรือหลังใบ จากการศึกษาที่ผ่านมาในการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุที่แท้จริงโดยแยกเชื้อจากอาการจุดดำ จึงทำให้เกิดความสับสนไม่ทราบว่าเป็นเชื้อใดเป็นเชื้อสาเหตุ จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ใช้หลายวิธีการมาช่วยประกอบในการวินิจฉัยถึงเชื้อสาเหตุของโรค เช่น การใช้สารฟาราควอด เพื่อช่วยในการตรวจเชื้อราจากแผลจุดดำ ซึ่งไปกระตุ้นการสร้างส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อ แสดงให้เห็นว่าเชื่อนี้มีการเจริญแบบแฝงซึ่งมักจะไม่สามารถร่องรอยของอาการที่ชัดเจนหรือส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อราในขณะที่เนื้อเยื่อยังอ่อนอยู่ สารฟาราควอดในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจะไปทำให้เนื้อเยื่ออ่อนนี้แห้งเร็วขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อพืชสูญเสียกลไกการป้องกันตัวเอง โดยสารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในเนื้อเยื่อพืช เสื่อมสภาพลง เป็นผลให้เชื้อที่แฝงอยู่สามารถปรากฏออกมาให้เห็น เป็นเส้นใยและกลุ่มสปอร์สีส้มของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เจริญบนใบที่มีอาการจุดดำและใบที่มีจุดเข็มในเนื้อใบเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ผลจากการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษที่เชื้อผลิตขึ้นโดยเปรียบเทียบสารพิษที่อยู่ในอาการแผลจุดดำและจากที่เชื้อรา *Colletotrichum* sp. ผลิตออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถพิสูจน์ได้ว่าเชื้อรา *Colletotrichum* sp. เป็นสาเหตุสำคัญของโรคใบจุดดำของลำไย

สำหรับแนวทางในการควบคุมหรือป้องกันกำจัดโรคใบจุดดำรวมทั้งโรคราดำได้ใบและโรคใบจุดสนิมของลำไยโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา พบว่าสารเคมีในกลุ่ม benomyl , captan , carbendazim , copper oxychloride และ mancozeb ตัวใดตัวหนึ่งหรือเลือกมากกว่าหนึ่ง เมื่อใช้ฉีดพ่นสลับกันทุก 2 สัปดาห์ ล้วนมีประสิทธิภาพในการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้หากมีการฉีดพ่นทันทีที่เริ่มพบอาการของโรค โดยเฉพาะในช่วงที่มีสภาพอากาศชื้นซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมกับการแพร่ระบาดของโรคทางใบของลำไย โดยกำหนดตารางการฉีดพ่นสารเคมีทุก 2 สัปดาห์ ก็จะเป็นการแก้ปัญหาในระยะสั้นเพื่อลดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคได้ แต่อย่างไรก็ตามการควบคุมโรคเหล่านี้ในระยะยาวโดยการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา คิดต่อกันเป็นเวลานานๆ ก็อาจจะทำให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น การพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีของเชื้อโรค และพิษตกค้างของการใช้สารเคมีที่มีต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม ดังนั้นการควบคุมโรคในระยะยาวจึงได้ศึกษาแนวทางการควบคุมโรคโดยชีววิธี ซึ่งได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และ ยีสต์ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุ จากการวิจัยในครั้งนี้พบว่า ในแง่ของการควบคุมตามสภาพธรรมชาติแล้วกลุ่มแอนทาโกนิสต์ที่เป็นเชื้อรา *Trichoderma* sp. นั้นอาจไม่เหมาะสมนำมาใช้ควบคุมเชื้อราทางใบ เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วเชื้อแบคทีเรียและยีสต์น่าจะเหมาะกับการใช้ควบคุมโรคทางใบมากกว่า เนื่องจากสามารถเจริญในลักษณะเชื้อทางผิวใบ (epiphyte) ได้ดีกว่า นอกจากนี้ในกลุ่มของยีสต์บางชนิดที่มีการยับยั้งในแบบ antibiosis แล้ว ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบบในด้านการแข่งขัน (competition) อีกด้วย ซึ่งจะสามารถช่วยลดจำนวนประชากรของเชื้อสาเหตุหรือเชื้อก่อโรคบนใบได้ สำหรับเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อ *Bacillus* sp. นั้นเป็นเชื้อที่มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ควบคุมโรคทางชีววิธี นอกจากเชื้อจะสามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมายับยั้งเชื้อสาเหตุของโรค หรือมีปฏิกริยายับยั้งแบบ antibiosis แล้ว เชื้อยังสามารถสร้าง endospore จึงมีความคงทนและมีชีวิตรอดในสภาพธรรมชาติได้ดี ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำเชื้อเหล่านี้ไปใช้ในสภาพธรรมชาติ จึงควรที่จะมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับเรื่องการเพิ่มสารอาหาร หรือสารรักษาสภาพ (preservative) เพื่อให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมเช่นความร้อนจากแสงแดดและความแห้งแล้งได้ดีขึ้น

บทที่ 9
โรคพุ่มแจ้ของลำไย

วิชา สหาคศ
ปริญญา จันทรศรี
สวัสดี พรหมอินทร์
วันเพ็ญ ศรีชาติ

9.1 การตรวจสอบสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของลำไย

โรคพุ่มแจ้ของลำไยเป็นโรคที่เกิดขึ้นกับยอดหรือส่วนที่แตกออกมาเป็นกิ่งแขนงของลำต้น โดยจะทำให้ส่วนที่แตกออกมานี้มีลักษณะเป็นกอหรือกระจุกคล้ายไม้กวาด ต้นที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ให้ผลผลิตเลย (ประสาทร, 2517) ผลลำไยที่ได้จากต้นที่เป็นโรคจิตสนิทไม่มีรสชาติ ในบางต้นและบางพันธุ์ให้รสเค็มอย่างเคียว และมีเนื้อเหนียวไม่เป็นที่ต้องการของตลาด วิชัยและคณะ (2521) ได้ทดลองใช้สารปฏิชีวนะ Tetracycline ฉีดเข้าลำต้นลำไยและราดลงดิน พบว่าใบอ่อนที่แตกออกมาใหม่บางส่วนหรือบางกิ่ง มีลักษณะคล้ายใบปกติแต่หลังจากนั้นไปอาการของโรคก็ยังไม่ดีขึ้น การทดลองใช้สารปฏิชีวนะ Tetracycline กับพืชชนิดอื่นที่เป็นโรคพุ่มแจ้ เช่นการใช้สารปฏิชีวนะ Tetracycline 1,000 ppm จุ่มรากของ *Ligustrum ovalifolium* แต่ก็ให้ผลในการป้องกันกำจัดเพียงชั่วคราวเท่านั้น (Chai Kim, 1989) นิวัฒน์และคณะ (2523) ได้ทดลองใช้สารปฏิชีวนะ Tetracycline ร่วมกับการใช้น้ำร้อน ป้องกันกำจัดท่อนพันธุ์อ้อยให้ปราศจากเชื้อมาโยพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวของอ้อย แต่ก็ยังได้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ นงลักษณ์ (2536) รายงานว่าการกำจัดโรคมายโคพลาสมาพืชหรือไฟโตพลาสมา (phytoplasma) นั้นกระทำได้ยาก และยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดโรคได้อย่างแท้จริง งานทดลองป้องกันกำจัดโรคแต่เพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถควบคุมสถานการณ์การระบาดของโรคพุ่มแจ้ที่เกิดกับพืชต่าง ๆ รวมทั้งลำไยได้อย่างถาวร

การป้องกันกำจัดแมลงที่เป็นพาหะของเชื้อมาโยพลาสมาก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดการแพร่ระบาดของโรคชนิดนี้ลง Licha (1980) รายงานว่าเพลี้ยจักจั่น *Empoasca fabae* เป็นพาหะนำโรคพุ่มแจ้ของถั่วมะแฮะ *Cajanus cajan* L. เมื่อทำการกำจัดแมลงทำให้การระบาดของโรคลดลง ในประเทศจีนและเกาหลีได้มีการทดลองใช้สารเคมีฆ่าแมลงป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่น *Hishimonus sellatus* ทำให้ลดการระบาดของโรคลงได้ (Sun et al, 1988; Yiern et al, 1988) อย่างไรก็ตามนงลักษณ์และคณะ (2528) ได้ทดลองใช้สารเคมีฆ่าแมลง เพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* Mat. ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อมาโยพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย พบว่าสามารถลดการระบาดของแมลงลงได้ แต่ไม่มีผลในการป้องกันกำจัดโรคมานักแสดงให้เห็นถึงเชื้อที่ถูกแมลงพาหะถ่ายทอดเข้าสู่พืชก่อนหน้านี้แล้ว มีแมลงหลายชนิดที่ได้มีผู้สำรวจพบในต้นลำไยที่เป็นโรคพุ่มแจ้ เช่นเพลี้ยไก่ฟ้า และแมลงหวี่ขาว ซึ่งคาดว่าแมลงเหล่านี้มีส่วนในการเป็นพาหะแพร่ระบาดของโรคพุ่มแจ้ในธรรมชาติ (นวลจันทร์และคณะ, 2519 ;เสาวรัตน์, 2533) แต่ยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดแต่อย่างใด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาในเรื่องของการวินิจฉัยชนิดและปริมาณ และความสามารถในการถ่ายทอดโรคของแมลงแต่ละชนิด

จากการศึกษาของคณะวิจัยพบว่ากรณียอดอ่อนของลำไยที่มีการแตกเป็นพุ่มแจ้คล้ายไม้กวาด ใบอ่อนเรียวยาวเล็ก หักงอ สามารถตรวจพบไรศัตรูพืชอยู่ในซอกที่แสดงอาการ ซึ่งไรเหล่านี้อยู่ในวงศ์ Eryophyidae เป็นไรในสกุล *Aceria* sp. ไรเหล่านี้เมื่อดูดทำลายบนส่วนต่าง ๆ ของพืชมักจะปล่อยสารพิษเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติในรูปแบบต่าง ๆ Emmanuel และ Papadoulis (1987) ได้รายงานว่า พบไรในวงศ์ Eryophyidae ชื่อ *Aceria medicaginis* เป็นพาหะนำโรคพุ่มแจ้

พืชเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ทำให้พืชแสดงอาการผิดปกติในรูปแบบต่าง ๆ Emmanuel และ Papadoulis (1987) ได้รายงานว่า พบไรในวงศ์ Eriophyidae ชื่อ *Aceria medicaginis* เป็นพาหะนำโรคพุ่มแจ้ของ lucerne เป็นครั้งแรกในประเทศไทย Coetzee และคณะ (1983) ได้ศึกษาไรบนพืชตระกูล Proteaceae ในแอฟริกาใต้พบว่าไร Eriophyidae ชื่อ *Aceria proteae* อาศัยอยู่ในพืชซึ่งแสดงอาการโรคพุ่มแจ้ เสาวรัตน์ (2533) รายงานว่า โรคใบม้วนหงิกของลำไยเกิดจากการเข้าทำลายของไรขา วงศ์ Tarsonemidae ทำให้เกิดความผิดปกติในส่วนต่างๆของลำไย ไม่ว่าจะเป็นลักษณะใบ ช่อดอกและจำนวนดอกร่วงหรือผลร่วง ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมากและอายุการเก็บรักษาสดลง นอกจากนี้ทำให้ความอ่อนแอและติดเชื้อได้มากกว่าผลลำไยจากต้นปกติด้วย

ลักษณะอาการพุ่มแจ้ของลำไยอาจเกิดเนื่องจากสารพิษที่ไรปล่อยเข้าสู่เนื้อเยื่อของพืชขณะดูดทำลายโดยตรง หรืออาจเกิดจากลักษณะอาการของโรคลำไยซึ่งมีไร ทำหน้าที่เป็นพาหะนำโรคซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาเพื่อทราบสาเหตุที่แท้จริงต่อไป สาเหตุที่ทำให้ลำไยมีอาการใบหงิก แตกเป็นพุ่มแจ้แม้ว่าจะมีผู้ศึกษาและวิจัยมาแล้วแต่ก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสาเหตุที่แท้จริงของโรคนี้อาจเกิดจากเชื้อโรคหรือแมลงศัตรู เนื่องจากโรคนี้นี้ได้มีการแพร่ระบาดแพร่หลายต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน และระบาดทั่วไปในพื้นที่ปลูกลำไยของจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ทำให้ความเสียหายรุนแรงมากขึ้นทุกปี และยังไม่สามารถหาวิธีป้องกันกำจัดอย่างมีประสิทธิภาพ

สำหรับวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุในงานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยามาใช้เช่นเดียวกันกับการตรวจสอบเชื้อมายโคพลาสมาในพืชอื่นๆ เช่น โรคใบขาวของอ้อย เป็นต้น นอกจากนี้ก็ได้นำวิธีการของปฏิกิริยาการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วน DNA เป้าหมายในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction : PCR) มาช่วยในการตรวจสอบอีกด้วย เนื่องจากวิธีการ PCR เป็นวิธีที่นำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยสาขาต่างๆ อย่างไรก็ตามยังคงเป็นเรื่องที่ยากในการที่จะมีสูตรสำเร็จของวิธีการทำ PCR ที่สามารถครอบคลุมการทำ PCR ทุกรูปแบบได้ ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นทำ PCR สำหรับการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการเริ่มตั้งแต่สกัดหน่วยพันธุกรรมที่จะตรวจสอบและปรับสภาพต่างๆให้เหมาะสมสำหรับงานนั้นๆ เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR เกิดขึ้นสูงสุด ดังนั้นในการศึกษาวิจัยของโครงการนี้จึงเป็นการนำเทคนิคนี้มาใช้เพิ่มเติมเพื่อการตรวจสอบสาเหตุที่แท้จริงของโรคพุ่มแจ้จากอีกทางหนึ่ง นอกเหนือไปจากวิธีทางเซรุ่มวิทยา เพื่อเป็นการหาวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุต่อไป

- วัตถุประสงค์
1. ตรวจสอบเชื้อสาเหตุที่แท้จริงของโรคพุ่มแจ้ของลำไยและการแพร่ระบาด หรือการถ่ายทอดของโรค
 2. หาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อสาเหตุของโรคพุ่มแจ้
 3. หาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้

วิธีการศึกษา

9.1.1 การตรวจสอบเนื้อเยื่อของลำไยที่แสดงอาการพุ่มแจ้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงผ่าน(Transmission Electron Microscope (TEM))

ทำการเก็บตัวอย่างยอดลำไยพันธุ์เบ๊ยวเขียวซึ่งอ่อนแอต่อโรคนี้ที่แสดงอาการพุ่มแจ้ ไปที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการกลาง ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อนำไปผ่านกระบวนการเตรียมและตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางเพื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เนื้อเยื่อที่ตัดเลือกจากส่วนยอดที่แตกเป็นฝอยคือในบริเวณจุดแตกแขนง ส่วนของก้านฝอย และส่วนของก้านใบฝอยที่โค้งงอ โดยบริเวณที่จะตรวจภายใต้กล้องจะเน้นบริเวณระบบท่อลำเลียง โดยเฉพาะ sieve cell

9.1.2 ศึกษาการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ

เก็บข้อที่แสดงอาการพุ่มแจ้จากสวนตามธรรมชาติ นำมาเชื้อไรจากภายในยอดเพื่อนำไปปล่อยลงบนยอดของต้นกล้าลำไยปกติอายุประมาณ 1 เดือน โดยทำการเชื้อไรจำนวน 30 ตัวต่อต้น แล้วนำไปไว้ในกรงกันแมลง ปล่อยให้ไรดูดกินประมาณ 1 เดือน บันทึกผลอาการที่เกิดขึ้นกับยอดที่แตกใหม่ของต้นลำไย

9.1.3 ศึกษาการถ่ายทอดโรคโดยฝอยทอง

เมล็ดพันธุ์ฝอยทอง *Cuscuta campestris* (ได้รับจากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร) นำมาเพาะและเพิ่มปริมาณบนต้นกล้าแพงพวย(*Catharanthus rosea*) เมื่อฝอยทองเจริญดีแล้วจึงนำไปพันกับยอดลำไยที่แสดงอาการหงิกหรือพุ่มแจ้แล้วนำปลายฝอยทองอีกข้างหนึ่งมาพันกับต้นแพงพวยปกติและยอดอ่อนของต้นกล้าลำไยปกติ (Figure 119) พันทิ้งไว้ประมาณ 2 สัปดาห์ เพื่อบันทึกผลที่เกิดขึ้น ฝอยทองที่พันติดกับยอดของแพงพวยและยอดอ่อนของลำไยนำมาตัดแบบ freezing microtome เพื่อตรวจดูลักษณะการดูดกินของฝอยทองกับพืชอาศัย



Figure 119. Dodder transmission from witches' broom symptom of longan shoot to healthy periwinkle plant.

9.1.4 ศึกษาการถ่ายทอดโรคแบบการเสียบกิ่ง (graft transmission)

เก็บตัวอย่างอาการพุ่มแจ้จากสภาพสวนตามธรรมชาติ โดยเลือกจากยอดที่ยังเขียวอยู่ นำมาแช่สารเคมีป้องกันกำจัดไร(amitraz) ประมาณ 15 – 30 นาที แล้วตัดส่วนยอดที่ยังเขียวอยู่ของช่อที่แสดงอาการพุ่มแจ้ นำมาเสียบลงบนกิ่งตอนของลำไยปกติ โดยวิธีเสียบแบบลิ้มแล้วพันด้วยเทปพลาสติกใสพันบริเวณที่เสียบให้สนิทคลุมถุงเพื่อรักษาความชื้นไว้ประมาณ 55 วัน ยอดพุ่มแจ้อีกส่วนหนึ่งนำมาเสียบยอดลงบนยอดแพงพวยปกติ แล้วพันด้วยเทปพลาสติกใสหรือ parafilm พันบริเวณที่เสียบให้สนิท (Figure 120) คลุมถุงเพื่อรักษาความชื้นไว้ประมาณ 5 วัน แล้วจึงนำถุงออก รอบันทึกอาการที่เกิดขึ้นบนต้นลำไยและต้นแพงพวย



Figure 120. Graft transmission was done by inserting the diseased longan shoot onto the healthy periwinkle plant.

9.1.5 การตรวจสอบเชื้อโดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR)

ตัวอย่างที่ใช้ในการตรวจสอบได้แก่ยอดของลำไยปกติและที่แสดงอาการพุ่มแจ้ ยอดของต้นกล่ำลำไยที่แสดงอาการใบหงิกเป็นพุ่มฝอยหลังจากปล่อยให้ไรโรคกิน และยอดของแพงพวยที่แสดงอาการเนื่อใบเป็นลอนขรุขระหลังการเสียบยอดด้วยยอดพุ่มแจ้ลำไย

ก. การเตรียมพืชทดลอง

นำยอดและใบที่แสดงอาการบดให้ละเอียดในโกร่งโดยใช้ในโตรเจนเหลวเป็นตัวช่วยในการบด และรักษาสภาพ ตัวอย่างที่บดแล้วสามารถนำไปเก็บไว้ที่ -80°C โดยห่อไว้ด้วย aluminium foil

ข. การสกัด DNA

ได้ใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1990), Weising *et al.* (1991), Adato *et al.* (1995) และ จันทร์จิรา (2541)

สำหรับตัวอย่างพืชที่เป็นลำไยนำมาสกัด DNA โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 0.1 – 0.3 กรัม ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.56 มิลลิลิตร เติม extraction buffer [4% (w/v) CTAB, 1%(w/v) PVPP, 100 mM Tris pH 8.0 10 มิลลิลิตร, 2.0 mM EDTA 0.4 มิลลิลิตร, 1.4 M NaCl 8.1816 กรัม, 2-mercaptoethanol 0.1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย sterile distilled deionized water จนได้ 100 มิลลิลิตร] ปริมาตร 600 – 800 µl แล้วนำไปอุ่นใน block heater อุณหภูมิ 60 °c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm 4°C 5 นาที
3. เก็บส่วนใส ใส่ในหลอดใหม่แล้วนำมาสกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24 :1) โดยผสมอัตรา 1:1 กลับหลอดไปมาเบา ๆ ให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
5. ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบน (โดยระวังอย่าดูดส่วนที่เป็นตะกอนติดมาด้วย) ใส่ลงหลอดอันใหม่ เติม 2-propanol ใส่ลงไปประมาณ 1 เท่าของสารละลาย แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ อาจจะสังเกตเห็นเป็นตะกอนสีขาวหรือดำมีมากจะเกิดเป็นเส้นสาย (หากไม่เกิดตะกอนให้นำไปแช่ที่ 4 °c ทิ้งข้ามคืนแล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอน)
6. นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
7. เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนไว้ ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ที่แช่เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งปล่อยให้ตะกอนแห้ง (air dry)
8. ละลายตะกอน DNA ที่ได้ด้วย TE + Rnase 5 –10 units (ตามสัดส่วนของตะกอนที่ได้) นำไปปั่นที่ 37 °c เพื่อขจัด RNA ประมาณ 30 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20°C เพื่อใช้การทดลองต่อไป

สำหรับตัวอย่างที่เป็นแพลงพวย ใช้วิธีการสกัด DNA โดยวิธี Small volume DNA extraction using method มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ :

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่ง ให้เป็นผงละเอียด
2. เติม 2% sterile CTAB extraction buffer 1 มิลลิลิตรบดให้เข้ากัน ดูดใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ และอุ่นที่ 55°C เป็นเวลา 20 นาที
3. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C 5 นาที เก็บส่วนใสที่อยู่ข้างบน 500 µl ใส่ในหลอดอันใหม่แล้วเติม 500 µl phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ผสมโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ
4. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C 5 นาที
5. ดูดสารละลายส่วนใสข้างบนอย่างระมัดระวัง ใส่ลงในหลอดอันใหม่ เติม 500 µl phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ผสมโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ
6. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C 5 นาที

7. คัดสารละลายส่วนใสข้างบนอย่างระมัดระวังลงในหลอดอันใหม่ (ควรจะมี ถ้าไม่ให้ทำซ้ำตามขั้นตอนที่ 5 และ 6) เติม 1/10 เท่าของปริมาตรด้วย 7.5 M ammonium acetate และ 100% ethanol ที่แช่เย็น 1 มิลลิลิตร

8. ผสมโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ และปล่อยให้ตกตะกอนที่ -20°C เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

9. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที

10. ล้างตะกอน 2 ครั้งด้วย 70 % (v/v) ethanol แต่ทุกครั้งโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ อย่างระมัดระวังอย่าให้ตะกอนละลายหลุดออกมา

11. ทำให้ตะกอนแห้งภายใต้สภาพสุญญากาศ ใน dessicator ตะกอนควรมีสีขาวหรือใสโปร่งแสง (ไม่ควรมีสี)

12. ละลายตะกอน DNA ที่ได้จาก TE buffer pH 8.0 50 μl เติม Rnase 5 units นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 37°C (ใน Block Heater) เป็นเวลา 15 นาที เพื่อขจัด RNA เก็บรักษา DNA ที่สกัดได้ไว้ที่ -20°C ก่อนนำไปวัดปริมาณ DNA

นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการสกัด DNA อีกวิธีการหนึ่งคือวิธี Total extraction procedure using Glycine / Phenol method มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ :

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 0.063 กรัม นำมาบดกับไนโตรเจนเหลวในโถรงบดยาให้ละเอียดเป็นผง

2. เติม Buffer G 0.5 มิลลิลิตร บดให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Buffer G = 0.375 g Glycine + 5 M NaCl 1 มิลลิลิตร + 0.5 M EDTA 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วย dd water ปรับ pH 9.5 filter sterilize ขนาด 0.2 μm เก็บไว้ที่ 4°C)

3. เติม phenol 500 μl แล้วนำไปเขย่าด้วย Vortex mixer 30 วินาที

4. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 15 นาที

5. คัดสารละลายข้างบนใสในหลอดใหม่ เติม 3 M sodium acetate pH 5.5 25 μl และ 100% ethanol 1.25 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วย Vortex mixer 30 วินาที

6. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 30 นาที

7. เก็บตะกอนและล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethanol ที่แช่เย็น

8. นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm 4°C เป็นเวลา 15 นาที

9. เทส่วนของ ethanol ที่ทิ้งไป และทำให้ตะกอนแห้งใน dessicator 10 – 15 นาที

10. ละลายตะกอน DNA (ควรมีสีขาวหรือโปร่งแสง) ด้วย TE buffer 100 μl เก็บไว้ที่ -20°C

สูตรการเตรียมสารที่ใช้ในการทดลอง :

TE (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid)

1 M Tris pH 8.0 5 ml

0.5 M EDTA pH 8.0 1 ml

ปรับปริมาตรด้วย de-ionized distilled water นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2% CTAB Buffer

50 ml Tris pH 8.0 + 50 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 + 40.88 g NaCl

ปรับปริมาตรด้วย dd water 490 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่ 40 – 60 °C เติม CTAB 10 g

ค. การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA

นำ DNA ที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (ใช้ 0.8% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris borate ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 µg/ml ตรวจสอบด้วย UV transilluminator) จากนั้นนำ DNA มาวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นและปรับเจือจางได้ปริมาณที่เหมาะสมกับในปฏิกิริยาของการทำ PCR

ง. ปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

การเลือกใช้ primers ใช้ universal primer U1 และ U2 ที่สังเคราะห์จาก BSU (Bioservice unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรม [U1 : 5'-3': GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ U2 : 5'-3': AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC] และใช้เงื่อนไขการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

อุณหภูมิ (°C)	94.0	94.0	60.0	72.0	72.0	4.0
	5 นาที	1 นาที	30 วินาที	1.30 นาที	10 นาที	∞

โดยให้มีรอบของปฏิกิริยา = 30 cycles

หลังการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนพันธุกรรมที่สกัดได้จากพืชทดสอบ ใช้ดีเอ็นเอจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว (ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย) เป็น positive check ในการตรวจสอบบน agarose gel electrophoresis

9.1.6 การตรวจสอบเชื้อโดยวิธีเซรุ่มวิทยา(Serology)

ก. การเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา

ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาจากลำไยที่เป็นโรคพุ่มแจ้ในต้นแพงพวย โดยวิธีการเสียบยอด ลำไยที่แสดงอาการพุ่มแจ้ลงบนยอดของต้นแพงพวย และใบแพงพวยที่แตกออกมาใหม่มีอาการใบหงิก เนื้อใบเป็นลอน ซึ่งแพงพวยเหล่านี้จะใช้สำหรับการแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์ (Purification) และนำไปฉีดสัตว์ทดลองเพื่อการผลิตแอนติเซรุ่มต่อไป

ข. การแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์ (Purification of phytoplasma)

นำยอดแพงพวยที่แสดงอาการใบหงิกหลังจากการเสียบยอด (และแพงพวยปกติเพื่อใช้เป็น control) ชั่งน้ำหนัก 100 กรัม ล้างผ่านน้ำไหลประมาณ 60 นาที ผึ่งให้แห้งในที่เย็น 0-4°C แล้วนำมาบดให้ละเอียดจนเป็นผง โดยใช้ไนโตรเจนเหลวช่วยให้การบดง่ายขึ้น ผสมด้วย GM buffer (0.3 M glycine-NaOH, pH 8.0, 0.02 M MgCl₂ และ 0.2% sodium mercaptoacetate) ที่แช่เย็นในอัตรา น้ำหนักตัวอย่างพืช 1 g/ 4 ml จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำกรองที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วต่อด้วย 8,000 มิลลิลิตรอีก 20 นาที ส่วนใสที่ได้นำมาเติมด้วย PEG 6,000 ในอัตรา 60 g/L แล้วบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการตกตะกอน เก็บตะกอนที่เกิดขึ้นโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 40 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้งละลายตะกอนด้วย 10% GM buffer เพื่อช่วยในการละลายตะกอนให้ดีขึ้นและเป็นการกำจัดสาร PEG ที่ตกค้างอยู่ออกไป ให้นำไปผ่านกระบวนการ "desalted" ใน Hitrap[®] Desalting column (Pharmacia Biotech Company) จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 กรัม เป็นเวลา 5 นาที สารสกัดที่ได้จากการเตรียมนำไปบ่มด้วย 5 % (v/v) rabbit anti-plant antiserum เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อลดการปนเปื้อนจาก plant antigens แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 กรัม เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 2,000 กรัม เป็นเวลา 5 นาที สารสกัดที่เตรียมได้นี้ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 63,000 กรัมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บ pellet (มีสีเขียวออกซีด) โดยการละลายด้วย phosphate - buffered saline (PBS) ก่อนนำไปดำเนินการในขั้นตอนต่อไป

ค. การผลิตแอนติเซรุ่มจากไฟโตพลาสมาที่ผ่านการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

ใช้กระต่ายสีขาวเพศผู้เป็นสัตว์ทดลอง ก่อนการฉีด antigen ให้เจาะเลือดเพื่อเก็บไว้เป็น normal serum การฉีด antigen กระทำโดยนำ pellet ที่ละลายใน PBS มาผสมกับ adjuvant ซึ่งตารางการฉีดได้กำหนดไว้ดังนี้ คือฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง โดยฉีดสลับทุกสัปดาห์เป็นเวลาทั้งหมด 4 สัปดาห์ โดยการฉีดครั้งแรกผสม antigen ที่เตรียมได้กับ Freund's complete adjuvant ในอัตรา 1 : 1 (ฉีดครั้งต่อไปผสมกับ Freund's incomplete adjuvant) ทำการเก็บเลือดกระต่ายจากบริเวณหู (marginal ear vein) หลังการฉีดครั้งสุดท้ายไปแล้ว 1 สัปดาห์ โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดที่โคนใบหูที่โคนขนและเช็ดด้วย 70 % ethanol ใช้ใบมีดสะอาดกรีดตามแนวยาวเส้นเลือดประมาณ 0.1 เซนติเมตร เก็บเลือดครั้งละประมาณ 10 มิลลิลิตร ไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เลือดแข็งตัว ใช้เข็มฉีดยาปลายแหลมทนไฟฆ่าเชื้อกรีดเยื่อที่ติดกับภาชนะให้หลุดออกเพื่อ

เก็บน้ำเหลือง (serum) แยกตัวจากเม็ดเลือดคั่งขึ้น เก็บไว้ข้ามคืนในตู้เย็น 4 °C นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกน้ำใสใส้หลอดแล้วเติม 0.5% sodium azide เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย

ง. การทดสอบทางเซรุ่มวิทยา

หาปริมาณ antibody ใน antiserum เพื่อกำหนดคุณภาพของ antiserum โดยดูจากปฏิกิริยาสุดท้ายของความเข้มข้นต่ำสุดของ antiserum ที่ทำปฏิกิริยากับ antigen คือการหาค่า titre ของ antiserum โดยการตกตะกอนในของเหลวบนแผ่น slide (Slide precipitation test) มีวิธีการดังนี้

นำ antiserum เจือจางด้วย 0.1 M PBS pH 7.4 ให้ได้ 1 : 2, 1 : 4 จนถึง 1 : 512 และนำ antigen ที่ใช้นิโคติรต่ำมาเจือจางด้วย 0.1 M PBS pH 7.4 ให้มีความเข้มข้น 1 : 10 จากนั้นหยด antiserum ลงกึ่งกลางแผ่นสไลด์ เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปสูง ประมาณ 20 µl ใช้ antigen 1 : 10 20 µl หยดลงข้างๆ antiserum ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันเริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปสูง ใช้ normal serum และ 0.1M PBS pH 7.4 ทำปฏิกิริยากับ antigen เป็นตัวเปรียบเทียบปฏิกิริยาที่ไม่เฉพาะเจาะจง นำไปบ่มไว้ในกล่องเก็บรักษาความชื้นเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วนำไปตรวจด้วยกล้อง dark field microscope เพื่อคัดเลือกว่า titre สูงเพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป ตรวจผลเปรียบเทียบกับน้ำคั้นแพงพวยปกติซึ่งเตรียมโดยวิธีการเดียวกับการเตรียมแพงพวยที่เป็นโรค และ normal serum เก็บ antiserum ไว้ที่ 4°C

9.1.7 การฟื้นฟูอาการของโรคพุ่มแฉ่ด้วยสารปฏิชีวนะ

ก. ผลของยาปฏิชีวนะ *Oxytetracycline Hydrochloride* ต่อการควบคุมอาการ *Witches' broom* ของลำไยพันธุ์ดอด้วยวิธีการ *Infusion* ทางราก

สภาพการทดลอง

สวนลำไยพันธุ์ดอ บ้านป่าเหว ต. อุโมงค์ อ. เมือง จ. ลำพูน ต้นอายุประมาณ 5 ปี เลือกจำนวน 4 ต้น ระยะปลูกประมาณ 5 เมตรและความสูงประมาณ 3.5 เมตร

ระยะเวลาทำการทดลอง : อยู่ระหว่างเดือนกันยายน 2540 - ตุลาคม 2540

การดูแลรักษาอื่น ๆ : เป็นสวนที่มีการให้น้ำในพื้นที่ปลูกลำไยที่ทดลองจากกระแสน้ำโดยรอบ มีการใช้ยาฆ่าหญ้าบ้าง สภาพของดิน ถ้าหากมีฝนตกมาก ๆ จะเกิดน้ำท่วมขัง ดินค่อนข้างเหนียว เมื่อแห้งจะแข็งมากเนื่องจากสภาพของสวนเป็นที่นาเก่า จึงมีคูน้ำรอบแปลงปลูก

วิธีการทดลอง

เลือกต้นลำไยพันธุ์ดอที่แสดงอาการ *Witches' broom* 4 ต้น ใช้เป็นต้นทดลอง 3 ต้นและเป็นต้น control 1 ต้น เมื่อได้ต้นแล้วทำการตัดแต่งกิ่งที่เป็นโรค กิ่งแห้ง และกิ่งที่แสดงอาการ *Witches' broom* ออกให้หมด ทำการขุดหารากแขนงที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว แล้วล้างดินที่ติดรากออกให้หมด และตัดรากด้วยเลื่อยตัดแต่งกิ่ง ใช้เทปขาวพองน้ำพันตรงปลายรอยตัดของราก 1 รอบ (พันห่างจากรอยตัดออกมา 1 เซนติเมตร) ใช้ชุดลูกยางปลายเปิด 3 ด้าน สวมเข้าไปตรงปลายรอยตัดของราก ให้เอาด้านที่ 2 ของชุดลูกยางสำหรับการทำ *infusion* (เป็นชุดเครื่องมือสำหรับการทำ *infusion* ที่ได้รับมาจากผู้เชี่ยวชาญชาว

ญี่ปุ่น: Professor Hidetosh Okamoto)สวม ใหล่ลายรอยตัดของรากอยู่ตรงกับด้านที่ 3 ของชุดลูกยางสีดำ (ด้านระบายอากาศ) ใช้เชือกหรือลวดเหล็กขนาดเล็ก ๆ ผูกท่อระบายอากาศให้ตั้งตรงขึ้นไปด้านบนไว้กับกิ่ง ลำไย จากนั้นใช้ลวดขนาดเล็กรัดตรงปลายของชุดลูกยางสีดำด้านที่ 2 รัดให้ตรงกับเทพกาวฟองน้ำซึ่งหุ้ม ปลายรากรองอยู่ด้านใน รัด 2 รอย ๆ ละ 2 ครั้ง และบิดลวดให้แน่นด้วยคีมเหล็ก แล้วสวมสายยางของชุด ให้สารละลายแบบที่ให้น้ำเกลือ เข้าตรงด้านที่ 1 ของชุดลูกยางสีดำ เสร็จแล้วเทน้ำยา Oxytetracycline Hydrochloride ลงไปในขวดพลาสติกขนาด 2 ลิตร ด้านปากขวดจะทำเป็นจุกสำหรับให้น้ำยาระบายลงไป ที่ ชุดลูกยางสีดำได้ น้ำยาที่ไหลลงมาจะถูกรากดูดเข้าไปตรงที่มีรอยตัดของราก ซึ่งอยู่ในชุดลูกยางสีดำ ต่อ จากนั้นทำการใส่ฟองอากาศออกตรงชุดลูกยางสีดำ โดยใช้ขวดยามือบีบและฉีดชุดลูกยางสีดำจนเห็นมีฟอง อากาศขึ้นตรงท่อระบายอากาศ ชุดให้น้ำยาจะถูกติดไว้กับกิ่งลำไยด้านบน และระดับน้ำยาในขวดจะต้อง อยู่ต่ำกว่าปลายของท่อระบายอากาศของชุดลูกยางสีดำปล่อยไว้ให้รากดูดน้ำยาโดยทิ้งไว้ 1 วัน แล้วจึงเก็บ ชุดให้น้ำยาออก

พ่นยาไมแทค (Mitac) (ชื่อสามัญ : อามิทราซ (amitraz) สารออกฤทธิ์ : N - methylbis (2,4 - xylyliminomethy) amine 20 % w/v E.C. อัตรา 30 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร ผสมกับสารจับใบไตรตันซีเอส - 7 อัตรา 5 ซีซี/น้ำ 20 ลิตร) ใช้ป้องกันและกำจัดไร ฉีดพ่นด้วยถังสะพาย ทำการฉีดพ่นให้ทั่วทรงพุ่มจนเปียกโชกทั้ง 4 ด้าน ระยะห่างของการพ่นยา 7 วัน/ ครั้ง

กรรมวิธีที่ใช้ในการทดลอง

กรรมวิธี	อัตรา (ppm) / ครั้งที่ 1	อัตรา (ppm) ครั้งที่ 2
1. Oxytetracycline Hydrochloride	100	200
2. Control	-	-

ระยะเวลาที่ทำการ Infusion เข้าทางรากโดยใช้ยาปฏิชีวนะ Oxytetracycline และ การพ่นยาป้องกันกำจัดไร

ครั้งที่	วันที่ทดลอง	ยาปฏิชีวนะ	พ่นยา (Mitac)
1	17 ก.ย. 40	/	
1	18 ก.ย. 40		/
2	24 ต.ค. 40		/
2	30 ต.ค. 40	/	

ข. การรักษาอาการฟุ่มเ้งโดยใช้วิธี *Trunk injection*)

โดยใช้สารปฏิชีวนะ oxytetracycline hydrochloride และสารป้องกันกำจัดโรคนิดูดซึม CONFIDOR 100 SL (imidacloprid) โดยแบ่งเป็นกรรมวิธีต่าง ๆ ฉีดเข้าลำต้นลำใบ

วิธีการทดลอง

เลือกต้นกล้าลำใบพันธุ์คอที่แสดงอาการฟุ่มเ้ง จำนวน 40 ต้น แล้วนำไปมาไรที่อาจติดมากับต้น ด้วยการฉีดพ่นด้วยสารฆ่าโรคนิดูดซึม CONFIDOR 100 SL (imidacloprid) อัตรา 8 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร แล้วตัดส่วนยอดที่หักออกจากนั้นใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสาร ตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฉีดสาร oxytetracycline hydrochloride ความเข้มข้น 1,000 ppm

กรรมวิธีที่ 2 ฉีดสาร oxytetracycline hydrochloride ความเข้มข้น 1,000 ppm + CONFIDOR ที่มี

ความเข้มข้นใน อัตรา 8 ซีซี / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ฉีด CONFIDOR อัตรา 8 ซีซี / น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ฉีดน้ำกลั่น (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

วิธีการฉีดเข้าสู่ลำต้นใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรดูดสารตามกรรมวิธีต่าง ๆ ที่ด้ามกดยกของเข็มฉีดยาพันเกลียวขางเอาไว้เพื่อให้เกิดแรงดันแล้วนำไปปักที่ลำต้นพืชทดสอบ ทิ้งไว้ให้สารละลายซึมเข้าสู่ต้นพืช แล้วคลุมด้วยถุงรีนีย์ จนกระทั่งมียอดใหม่แตกออกมา จึงนำถุงที่คลุมออก

ผลการทดลอง

9.1.1 ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาภายในเนื้อเยื่อของลำใบที่เป็นโรคจากสภาพธรรมชาติ

หลังกระบวนการเตรียมและตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางจากบริเวณก้านใบของยอดลำใบที่แสดงอาการฟุ่มเ้งและเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยเลือกดูบริเวณระบบท่อลำเลียงอาหารคือบริเวณ sieve cell พบกลุ่มเซลล์ของไฟโตพลาสมาค่อนข้างน้อยมากโดยมีลักษณะเป็นแบบ coccooid และต้องใช้ตัวอย่างที่เตรียมไว้ตรวจสอบจำนวนหลายตัวอย่างกว่าจะตรวจพบกลุ่มเซลล์ดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงปริมาณของเชื้อที่น้อยมากในเนื้อเยื่อของลำใบที่เป็นโรคฟุ่มเ้งจากสภาพธรรมชาติ

9.1.2 ผลการถ่ายทอดโรคโดยไรและการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ต้นกล้าลำใบที่ผ่านการดูกินโดยไร พบว่าแสดงอาการแตกยอดออกเป็นพุ่มฝอยเมื่อปล่องไรลงไปประมาณ 27 วัน เมื่อนำเนื้อเยื่อจากส่วนของก้านฝอยไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถตรวจพบกลุ่มเซลล์ของไฟโตพลาสมาได้ชัดเจน(Figure 121) และมีปริมาณมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากยอดที่หักในสภาพธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากอาการที่เริ่มพัฒนาขึ้นในเนื้อเยื่อเจริญใหม่ ๆ ในต้นกล้าลำใบ เซลล์ของไฟโตพลาสมามีการเพิ่มจำนวนในระยะแรก จึงทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ชัดเจนกว่า

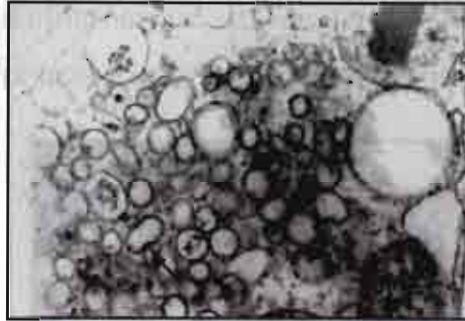


Figure 121. Mycoplasma (Phytoplasma) like bodies in cytoplasm of infected phloem parenchyma cell of longan seedling. (arrow) X 42,000.

9.1.3 ผลการถ่ายทอดโรคโดยฝอยทอง

เมื่อปลอ่ยฝอยทองให้ดูคูกินบนยอดลำไยที่แสดงอาการพุ่มแจ้ จนเจริญดี จากนั้นตัดเอาฝอยทองที่คาดว่าจะมีเชื้อสาเหตุของโรคพุ่มแจ้ มาถ่ายเชื้อลงบนแพงพวย อาการที่แสดงออกบนแพงพวยที่ได้รับการถ่ายเชื้อ บริเวณเนื้อใบมีลักษณะเป็นลอนขรุขระและบางต้นบริเวณ โคยรอบเส้น vein จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวออกเหลืองเมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณเนื้อใบ เมื่อตัดบริเวณที่ฝอยทองคูกินเนื้อเยื่อของยอดพุ่มแจ้และต้นแพงพวยแบบ freezing microtome แล้วตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าฝอยทองสามารถสร้าง haustorium แทะทะลุผ่านเนื้อเยื่อของยอดพุ่มแจ้ของลำไยและต้นแพงพวยได้ (Figure 122)

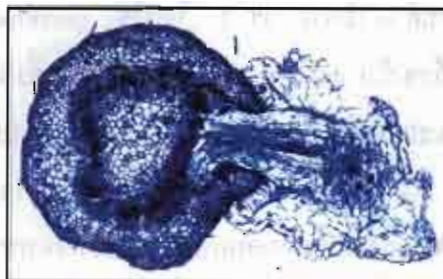


Figure 122. Dodder can produced haustorium and penetrate into periwinkle tissues.

9.1.4 ผลการถ่ายทอดโรคโดยการเสียบกิ่ง

จากการเสียบยอดของลำไยที่แสดงอาการพุ่มแจ้ลงบนกิ่งตอนลำไยปกติและต้นแพงพวย ปกติจากนั้นบำรุงให้กิ่งตอนลำไยและต้นแพงพวยเจริญแตกยอดอ่อน พบว่าผลจากการเสียบยอดลงบนกิ่งตอนนั้นไม่สามารถเชื่อมติดกันได้ โดยยอดที่นำมาเสียบนั้นมักจะแห้งตายไปก่อน อีกทั้งเนื้อเยื่อบริเวณยอดที่แสดงอาการพุ่มแจ้เป็นเนื้อเยื่ออ่อน โอกาสที่จะเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อของกิ่งตอนที่เป็น ไม้เนื้อแข็งกว่าจึงเป็นไปได้

ยาก สำหรับการเลียบยอดลงบนต้นแพงพวยแม้ว่ายอดลำไยที่แสดงอาการพุ่มแจ้จะเหี่ยวแห้งตายไปหลังการเลียบประมาณ 7 วัน แต่พบว่าหลังจากการเลียบยอดประมาณ 15 วัน ยอดแพงพวยที่แตกออกมาใหม่ แสดงอาการของเนื่อใบที่มีลักษณะเป็นคลื่น (Figure 123) ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้ว่าน้ำคั้นจากยอดลำไยที่เป็นโรคสามารถถ่ายลงยอดแพงพวย เป็นผลให้เชื้อที่อยู่ในน้ำคั้นสามารถผ่านเข้าไปภายในต้นแพงพวยได้



Figure 123. After graft transmission for 15 days, the infested periwinkle plant showed twisted leaves.

9.1.5 ผลการตรวจสอบด้วย PCR

จากตัวอย่างยอดลำไยปกติ ยอดของต้นกล้ายำไยที่ผ่านการคัดกินด้วยไรและแสดงอาการยอดแตกเป็นพุ่มฝอย และยอดแพงพวยปกติ แพงพวยที่ผ่านการเลียบยอดพุ่มแจ้ลำไยและแสดงอาการเนื่อใบเป็นคลื่น เมื่อนำไปสกัด DNA และตรวจสอบด้วยวิธีการ PCR โดยใช้ universal primer U1&U2 และใช้ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยเป็น positive check เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่แยกได้จากตัวอย่างทั้งหมดนี้ และนำมาตรวจสอบใน gel electrophoresis พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ของไฟโตพลาสมาขนาดใกล้เคียงกับ band ที่เป็น positive check ของโรคใบขาวของอ้อยคือ 1.35 kb (Figure 124) ซึ่งพอสรุปได้ว่าในตัวอย่างลำไยที่แตกยอดเป็นพุ่มฝอยทั้งจากสภาพธรรมชาติและผ่านการคัดกินจากไร และแพงพวยที่ผ่านการเลียบยอดมีเชื้อไฟโตพลาสมา ในขณะที่จากตัวอย่างปกติไม่พบ band เกิดขึ้น หรือไม่พบแบบพันธุกรรมที่เหมือนกับเชื้อไฟโตพลาสมา

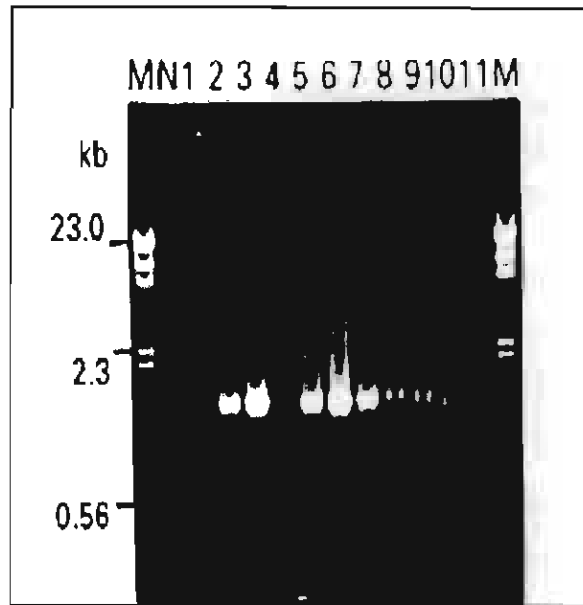


Figure 124. Universal primers (U1&U2) amplified DNA fragments of phytoplasma from longan with witches' broom symptom (8),periwinkle (9),longan shoot with mite feeding symptom (10) and sugarcane with white leaf symptom (3,5,6,7).

1 = negative check 2= positive check : phytoplasma associated with sugarcane white leaf

3,5, 6, 7 = white leaf of sugarcane sample 1, 2, 3, 4 4 = healthy sugarcane

8 = witches' broom of longan shoot sample

9 = periwinkle after graft transmission

10 = longan shoot after mite feeding

11 = healthy longan shoot sample

9.1.6 ผลการตรวจเชื้อทางเซรัมวิทยา

ได้ทำการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาจากลำไยไว้ในต้นแพงพวย เช่นเดียวกับการศึกษาไฟโตพลาสมาในพืชอื่นเช่นโรคใบขาวอ้อย เพื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Purification) เพราะต้องการ antigen ที่มากพอนำไปฉีดกระตุ้นเพื่อกระตุ้นให้สร้าง antibody แพงพวยที่ผ่านการเลี้ยงขยายด้วยลำไยที่เป็นพุ่มแจ้ ยอดที่แตกออกมาใหม่แสดงอาการเหี่ยวหงิกเป็นคลื่นภายในระยะเวลาประมาณ 15 วัน เมื่อนำมาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ตามกรรมวิธีที่กำหนด ได้ตะกอน (pellet) ในชั้นสุดท้ายมีสีเขียวออกเหลืองซีด ตะกอนที่ได้นี้ใช้เป็น antigen ฉีดกระตุ้นตามตารางเวลาที่กำหนดไว้ เมื่อเจาะเลือดกระตุ้นมาทำการทดสอบคุณสมบัติของ antiserum ที่ได้ พบว่า titre ที่ได้มีค่าต่ำมากคือ 1 : 64 เมื่อทำการฉีดกระตุ้น และเจาะเลือดมาตรวจสอบอีกครั้ง ผลที่ได้ยังคงได้ค่าที่ต่ำเช่นเดิม ซึ่งไม่สามารถนำ antiserum นี้ไปดำเนินการทดลองในขั้นตอนต่อไปในการใช้เป็นตัวตรวจสอบลำไยที่เป็นโรคพุ่มแจ้ได้

9.1.7 ผลการฟื้นฟูต้นลำไยที่เป็นโรคพุ่มแฉ่ด้วยสารปฏิชีวนะ

ก. ผลการทดลองการฟื้นฟูโดยวิธี infusion (ครั้งที่ 1)

เนื่องจากสภาพพื้นที่ที่ทำการทดลอง มีระดับของความชื้นในดินค่อนข้างสูง เพราะเป็นที่ลุ่มติดกับคูน้ำ ดังนั้นอัตราการ infuse ของน้ำยาเข้าสู่ราก จึงเป็นไปได้ค่อนข้างช้ามาก หลังจากที่ดินลำไยได้รับสาร Oxytetracycline Hydrochloride โดยวิธี Infusion ทางรากแล้วพบว่า

ต้นลำไยทดลองที่ 1 เมื่อให้ยา 2 ลิตร/ 2 ราก มีใบอ่อนกำลังแตกใหม่สีแดงทั่วทรงพุ่ม ประมาณการแตกของใบมากกว่า 50% ของยอดทั่วทรงพุ่ม ให้ระดับการแตกใบและมีอาการ Witches' broom ร่วมอยู่ในระดับ 1 ต้นลำไยทดลองที่ 2 เมื่อให้ยา 3 ลิตร/ 3 รากมีใบอ่อนกำลังแตกใหม่สีแดงทั่วทรงพุ่ม ประมาณการแตกของใบมากกว่า 50% ของยอดทั่วทรงพุ่ม ให้ระดับการแตกใบและมีอาการ Witches' broom ร่วมอยู่ในระดับ 1 ต้นลำไยทดลองที่ 3 เมื่อให้ยา 3 ลิตร/ 3 รากมีใบอ่อนแตกใหม่สีแดงทั่วทรงพุ่ม ประมาณการแตกของใบมากกว่า 50% ของยอดทั่วทรงพุ่มให้ระดับการแตกใบและมีอาการ Witches' broom ร่วมอยู่ในระดับ 1 ส่วน Control กำลังโผล่ยอดอ่อนเล็ก ๆ ใบยังไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงประมาณการแตกยอดและมีใบอ่อนทั่วทรงพุ่มน้อยกว่า 50% และให้ระดับการแตกใบอ่อนและมีอาการ Witches' broom ร่วมอยู่ในระดับ 1 แต่จะสังเกตใบที่แสดง อาการ Witches' broom ค่อนข้างยากเพราะยอดที่โผล่ส่วนใหญ่ใบอ่อนยังไม่คลี่ใบ

หมายเหตุ ระดับการแตกใบซึ่งมีอาการ Witches' broom หลังจากต้นลำไยได้รับยา Oxytetracycline Hydrochloride

- ระดับ 1 ใบอ่อนแสดงอาการ Witches' broom ต่ำกว่า 25 % ของยอดที่แตกใบ ทั่วทรงพุ่มต้น
- ระดับ 2 ใบแสดงอาการ Witches' broom อยู่ในช่วง 25 - 50% ของยอดที่แตกใบ ทั่วทรงพุ่มต้น
- ระดับ 3 ใบแสดงอาการ Witches' broom อยู่ในช่วง 50 - 70% ของยอดที่แตกใบ ทั่วทรงพุ่มต้น
- ระดับ 4 ใบแสดงอาการ Witches' broom อยู่ในช่วง 70 - 100% ของยอดที่แตกใบ ทั่วทรงพุ่มต้น

ข. ผลการรักษาอาการพุ่มแฉ่โดยวิธี trunk injection

ผลการฉีดสารละลายชนิดต่างๆเข้าสู่ลำต้นลำไย พบว่าในกรรมวิธีที่ใช้สารปฏิชีวนะและสารปฏิชีวนะผสมสารฆ่าไรชนิดดูดซึมฉีดเข้าลำต้นของลำไย มีอัตราส่วนของต้นที่ยอดแตกออกมาปกติกับยอดหงิกอยู่เท่ากับ 50% ส่วนกรรมวิธีที่ฉีดด้วยสารฆ่าไรเพียงอย่างเดียวมีอัตราส่วนของต้นที่ยอดแตกออกมาปกติกับยอดหงิกอยู่เท่ากับ 60% ในขณะที่กรรมวิธีที่ฉีดด้วยน้ำมีอัตราส่วนของต้นที่ยอดแตกออกมาแสดงอาการหงิกเท่ากับ 70 % (Table 116) จากการทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารปฏิชีวนะสามารถลดอัตราการเกิดยอดพุ่มแฉ่ได้ เพราะจากสภาพการทดลองในเรื่องของการฉีดสารเข้าสู่ลำต้นนั้นไม่สามารถฉีดสารเข้าไปได้ทีเดียว ต้องปักเข็มคาไว้ที่ต้นแล้วอาศัยแรงดันจากเกลียวของยางที่รัดไว้ที่ด้าม เพื่อปล่อยให้สารละลายค่อย ๆ ซึมเข้าสู่ลำต้นซึ่งกินเวลามากกว่า 7 วัน อาจเป็นผลทำให้สารปฏิชีวนะเสื่อมสภาพเพราะโดนแสงแดดและความร้อน ซึ่งสังเกตได้จากสีของสารละลายของสารปฏิชีวนะและสารฆ่าไรเปลี่ยนไปจากเริ่มทำการทดลอง รวมทั้งปริมาณของสารที่ฉีดเข้าสู่ลำต้นอาจมีปริมาณไม่เพียงพอเนื่องจากเข้าสู่ลำต้นพืชทดสอบได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิลิตรจากในแต่ละกรรมวิธี

Table 116. Treatments of different solutions containing antibiotic and acaricide and amount of solution in milliliters given to longan plants by trunk injection method

Treatment	Volume of solution uptake (average from 10 plants)	% witches' broom of new shoot produced	No. of mites were detected from shoot
Oxytetracycline	0.435 ml	50	None
Oxytetracycline + Confidor	0.430 ml	50	None
Confidor	0.450 ml	60	None
Distilled water	0.500 ml	70	None

สรุปผลการศึกษา

โรคพุ่มแฉ่งของลำไยที่พบในสภาพธรรมชาติ มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาโดยมีพาหะที่สำคัญคือไร อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาภายในเนื้อเยื่อของลำไยที่เป็นโรคจากสภาพธรรมชาติ พบกลุ่มเซลล์ของเชื้อไฟโตพลาสมาในระบบท่อลำเลียงอาหารหรือ sieve cell ก่อนข้างน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ของเชื้อนี้ในเนื้อเยื่อของยอดที่แสดงอาการแตกเป็นพุ่มฝอยของต้นกล้าลำไยที่เกิดจากการดูดกินด้วยไร ซึ่งจะพบได้ชัดเจนและมากกว่า อาจเป็นเพราะอาการที่เริ่มพัฒนาขึ้นในเนื้อเยื่อเจริญใหม่ ๆ ในต้นกลลำไย เซลล์ของไฟโตพลาสมามีการเพิ่มจำนวนในระยะแรก จึงทำให้มีโอกาสตรวจพบเชื้อได้ชัดเจนกว่าในสภาพธรรมชาติ โรคพุ่มแฉ่งนี้ยังสามารถถ่ายทอดเชื้อลงสู่ต้นแพงพวยปกติได้โดยการเสียบยอดและฝอยทองโดยทำให้เกิดอาการเนื่อใบของแพงพวยอีกเป็นลอนขรุขระ จึงสามารถใช้แพงพวยเป็นแหล่งเพิ่มปริมาณของเชื้อเพื่อใช้ในการศึกษาทางด้านเชรุ่มวิทยาและทางด้านชีวโมเลกุล

การศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลโดยการใช้เทคนิค PCR เพื่อช่วยในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุสามารถพบเชื้อไฟโตพลาสมาภายในเนื้อเยื่อของลำไยที่แสดงอาการพุ่มแฉ่งและในแพงพวยที่ผ่านการถ่ายทอดเชื้อโดยการเสียบยอดและฝอยทอง ซึ่งเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบชิ้นส่วนพันธุกรรมที่มีปริมาณน้อยได้ โดยการเพิ่มชิ้นส่วนพันธุกรรมนั้นโดยใช้ primer จึงสามารถพิสูจน์ได้ว่าชิ้นส่วนพันธุกรรมที่ถูกขยายออกมานั้น เป็นชิ้นส่วนพันธุกรรมเดียวกับเชื้อไฟโตพลาสมา

เนื่องจากตัวอย่างโรคที่เก็บจากสภาพธรรมชาติมีปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในเนื้อเยื่อที่เป็นโรคค่อนข้างน้อยมากซึ่งเห็นได้จากผลการนำไปตรวจตัวอย่างด้วย TEM จึงจำเป็นต้องอาศัยแพงพวยเป็นแหล่งเพิ่มปริมาณเชื้อ เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์สำหรับการผลิตแอนติเชรุ่มต่อไป สำหรับการผลิตแอนติเชรุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ่งของลำไยนั้น จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าคุณภาพของแอนติเชรุ่มที่ได้ก็ยังคงมีค่า titre ที่ต่ำมาก ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยตัวอย่างลำไยที่ต้องการทราบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาหรือไม่ ปัญหาหรืออุปสรรคในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ก็คือไม่สามารถ

ตรวจสอบไฟโตพลาสมาที่ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์(purification)แล้ว ซึ่งต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนช่วยในการตรวจสอบ จึงทำให้ไม่ทราบว่าสารที่สกัดได้มีเชื้อไฟโตพลาสมามากน้อยเพียงใด อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาในเซลล์พืชมีต่ำมากเมื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำไปฉีดสัตว์ทดลองทันที ยังไม่เพียงพอที่จะไปกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดี ดังนั้นแอนติเซรัมที่ผลิตได้จึงยังคงมีคุณภาพที่ต่ำไม่สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบวินิจฉัยโรคได้ แม้ว่าจะทำการฉีดกระตุ้นแล้วก็ตาม คุณภาพของแอนติเซรัมยังคงมีค่า titre ต่ำเช่นเดิม อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ก็ได้พัฒนาวิธีการอื่นมาใช้ในการตรวจหาเชื้อสาเหตุของอาการพุ่มแจ้ของลำไยแทนวิธีการทางเซรัมวิทยา นั่นคือการใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการตรวจสอบคือใช้เทคนิคของ PCR ก็สามารถพิสูจน์ได้ว่าอาการพุ่มแจ้ของลำไยเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางวิชาการเกี่ยวกับโรคนี้ได้อีกมาก แต่ในแง่การนำไปใช้ตรวจสอบวินิจฉัยพืชเป็นจำนวนมากให้แก่เกษตรกร อาจจะยังไม่เหมาะสมเนื่องจากวิธีการทางชีวโมเลกุลมีค่าใช้จ่ายในเรื่องของอุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีที่สูงมาก จำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคอีกต่อไป

แนวทางการป้องกันกำจัดหรือการรักษาอาการของโรคพุ่มแจ้ของลำไยโดยใช้สารปฏิชีวนะยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร จากการศึกษาพบว่าสามารถชะลออาการได้เพียงระยะหนึ่งเท่านั้น ต่อมาลำไยก็ยังคงแตกยอดพุ่มแจ้ขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยหลายอย่างเช่นวิธีการให้สารปฏิชีวนะเข้าสู่ภายในต้นลำไยอาจไม่ถึงเชื้อเป้าหมาย เพราะจากการศึกษาพบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาจะอยู่ใน sieve cell ที่อยู่ในระบบท่อลำเลียงอาหารของพืช ดังนั้นเครื่องมือที่จะนำสารปฏิชีวนะอาจจะยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะนำสารเข้าไปถึงบริเวณแหล่งที่อยู่ของเชื้อภายในเซลล์พืช นอกจากนี้การที่ไม่สามารถควบคุมแมลงพาหะคือไร ที่มีอยู่ในธรรมชาติได้ทั้งหมด อีกทั้งสภาพต้นที่ไม่สมบูรณ์เมื่อมีศัตรูพืชเข้าทำลายมาก ๆ เช่นหนอนเจาะลำต้น ก็มีโอกาทำให้ต้นลำไยแสดงอาการของโรครุนแรงและปรากฏชัดเจนยิ่งขึ้น การป้องกันกำจัดโรคนี้ต้องกระทำหลาย ๆ ด้านทั้งในเรื่องของการกำจัดแมลงพาหะ การบำรุงต้นให้มีสภาพแข็งแรง และการหลีกเลี่ยงการใช้กิ่งพันธุ์ที่มาจากต้นที่เป็นโรค ก็จะเป็นการช่วยลดปัญหาของโรคนี้ลงได้.

บทที่ 10
การผลิตลำไยปราศจากโรค
โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิชา สอดส่อง
อภิชชา วงศ์เจริญสถิตย์
ปริญญา จันทศรี
สวัสดิ์ พรหมอินทร์
วันเพ็ญ ศรีชาติ

คำนำ

การขยายพันธุ์ลำไยในปัจจุบันนิยมใช้การตอนมากที่สุด นอกจากนี้อาจขยายพันธุ์โดยการทาบกิ่งและการเพาะเมล็ด (สุรชัย, 2535) แต่พบว่ากิ่งพันธุ์ที่ได้จากการตอนมักประสบปัญหา กิ่งพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ติดเชื้อได้ง่าย และวิธีการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ยังไม่สามารถที่จะยืนยันได้ว่าเป็นต้น ที่ปราศจากโรค โดยเฉพาะโรคพุ่มแจ้ของลำไย โรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยการติดไปกับส่วนของพืชที่ใช้ในการขยายพันธุ์ เช่น กิ่ง ตา หรือยอด วิธีหนึ่งที่สามารถช่วยลดปัญหาข้างต้นได้ คือการพัฒนาเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ ซึ่งมีไม่ผลหลายชนิดที่สามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ ขนุน (Rahman และ Blake, 1988; Roy และคณะ, 1990) พืชตระกูลส้ม (Grosser และ Chandler, 1986) มะละกอ (Litz และ Conover, 1978) แอปเปิ้ล (Belaizi และคณะ 1991) เป็นต้น ซึ่งทำให้ได้ต้นพันธุ์ปราศจากโรค และสามารถขยายพันธุ์ได้ในปริมาณมากเพื่อการเพาะปลูก

นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังเป็นเทคนิคพื้นฐานสำหรับการศึกษาทดลองปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มโอกาสในการได้พันธุ์ที่ต้องการ เช่น พันธุ์ต้านทานโรคพันธุ์ทนแล้งและคุณภาพดี หรือการศึกษาด้านอื่นๆ เช่นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อโรคกับพืชอาศัย การศึกษาการป้องกันกำจัดโรคด้วย เป็นต้น

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้นำเอาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้เพื่อผลิตต้นพันธุ์ลำไยที่มีลักษณะเหมือนต้นแม่ที่มีลักษณะดีให้ผลผลิตสูง และปราศจากโรคให้ได้เป็นจำนวนมาก

- วัตถุประสงค์ 1. เพื่อทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำไย
2. เพื่อให้ได้วิธีการผลิตและขยายพันธุ์ลำไยที่ปราศจากโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

วิธีการทดลอง

1. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

อาหารที่นำมาใช้ในการทดลองคือ อาหารสูตรของ Murashige และ Skoog (MS) โดยได้ทำการเตรียมไว้เป็นสารละลาย stock มีขั้นตอนการเตรียมแสดงไว้ใน (Figure 125)

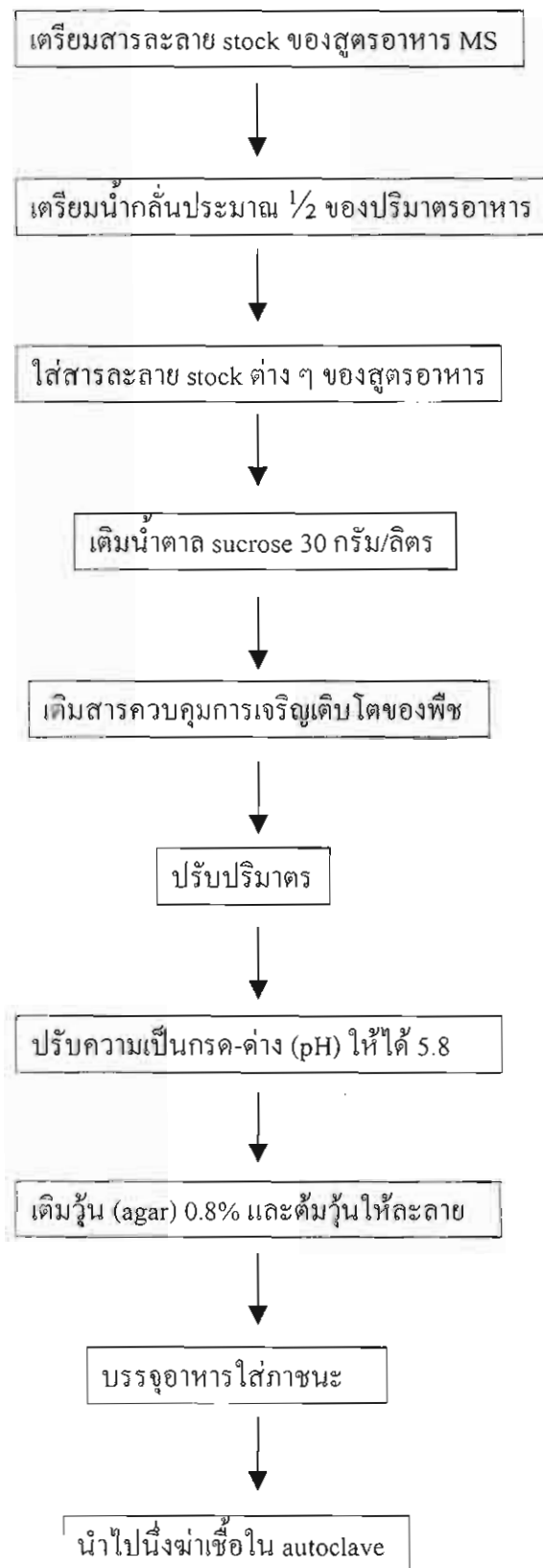
- สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นำมาเติมในอาหารสูตรพื้นฐาน MS

สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่นำมาใช้ในการทดลองได้แก่ สารกลุ่มของออกซิน ไซโตไคนิน และจิบเบอเรลลิน กลุ่มของออกซินที่ใช้คือ 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), NAA (naphthaleneacetic acid) และ IAA (indole-3-acetic acid) กลุ่มของไซโตไคนินได้แก่ kinetin (6-furfurylamionpurin) และ BA (6-benzyladenine) ส่วนจิบเบอเรลลินที่ใช้คือ GA₃ (gibberellic acid) การเตรียม stock solution ของ สารชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 100 mg/l ทำได้ดังนี้

กลุ่มของออกซิน เตรียมโดยชั่งสาร 0.01 กรัมของ 2,4-D, NAA, หรือ IAA ละลายใน 2-5 มิลลิลิตร ของแอลกอฮอล์ (ethanol) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

กลุ่มของไซโตไคนิน เตรียมโดยชั่งสาร 0.01 กรัมของ kinetin หรือ BA ละลายใน 1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (HCl) ปริมาณเล็กน้อย นำไปให้ความร้อน hot plate จนกระทั่งละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมจิบเบอเรลลินชั่ง 0.01 กรัม ของ GA₃ ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร



2. การเตรียมต้นกล้าลำไยที่ได้จากการเพาะเมล็ด

ต้นกล้าลำไยพันธุ์ดอเตรียมได้จากการเพาะเมล็ดบนเมล็ดบนอาหารวุ้น 0.4% ในสภาพปลอดเชื้อตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- นำผลลำไยมาแกะเนื้อออกให้เปลือกแต่เมล็ด จากนั้นล้างเมล็ดด้วยน้ำให้สะอาด
- ทำความสะอาดเมล็ดด้วย 0.05% นํ้ายาทำความสะอาดทีโพล (Teepol)[®] นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำประปา
- แช่เมล็ดใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 2-3 นาที จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ผิวใน 10 % (v/v) ของสารละลาย 10 % sodium hypochlorite ที่เติม Tween 20 ลงไป (2-3 หยดในสารละลาย 200 ml) นาน 30 นาที เช้าขวดเป็นครั้งคราวในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ
- ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
- วางเมล็ดบนอาหารวุ้น 0.4 % โดยใช้ปากคีบปลอดเชื้อกดเมล็ดให้อยู่ในวุ้นประมาณ 1/2 เมล็ด
- เพาะเมล็ดภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน

3. การหาชิ้นส่วนของพืชที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำต้นกล้าลำไยพันธุ์ดอที่เลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ คัดเลือกเฉพาะต้นที่สมบูรณ์แข็งแรง ใช้ปากคีบปลอดเชื้อดึงต้นกล้า วางบนจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้มีดตัดชิ้นส่วนของต้นกล้า ได้แก่ ส่วนใบขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร ลำต้นขนาดยาว 1 เซนติเมตรและรากขนาดยาว 1 เซนติเมตร (Figure 126) วางชิ้นส่วนต่างๆ บนอาหารพื้นฐานสูตร MS ,อาหารสูตร MS ที่ประกอบ ด้วย kinetin 0.1 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l และอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 0.1 mg/l และ NAA 1.0 mg/l เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ศึกษาการเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 4 สัปดาห์



Figure 126. Root, young stem and leaf portions of longan were used in tissue culture study.

4. การเจริญและพัฒนาของส่วนใบและลำต้นบนอาหารชนิดต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นบนอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตรวม 75 สูตร ซึ่งเตรียมจากแผนภาพดังนี้

ความเข้มข้น (mg/l)		Kinetin					BA				
		0	0.5	1.0	1.5	2.0	0	0.5	1.0	1.5	2.0
2,4-D	0	A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	B3	B4	B5
	0.5	A6	A7	A8	A9	A10	B6	B7	B8	B9	B10
	1.0	A11	A12	A13	A14	A15	B11	B12	B13	B14	B15
	1.5	A16	A17	A18	A19	A20	B16	B17	B18	B19	B20
	2.0	A21	A22	A23	A24	A25	B21	B22	B23	B24	B25

ความเข้มข้น (mg/l)		Kinetin				
		0	0.5	1.0	1.5	2.0
NAA	0	C1	C2	C3	C4	C5
	0.5	C6	C7	C8	C9	C10
	1.0	C11	C12	C13	C14	C15
	1.5	C16	C17	C18	C19	C20
	2.0	C21	C22	C23	C24	C25

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจาก เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

5. การศึกษาผลของ BA และ kinetin ต่อการชักนำให้เกิดยอด

ใช้มีดผ่าตัดปลอดเชื้อตัดส่วนข้อที่ประกอบด้วยตาข้างของต้นกล้าลำไย ให้มีขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร นำไปวางไว้บนสูตรอาหาร MS ที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ BA และ kinetin ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 mg/l แล้วทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาเป็นส่วนยอดจากส่วนข้อ

6. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำไยจากต้นพันธุ์จากสภาพสวนธรรมชาติ

การเพาะเลี้ยงส่วนยอดที่พัฒนามาจากตาข้างและเมล็ดของลำไยจากต้นพันธุ์จากสภาพสวนธรรมชาติ

เก็บส่วนตาข้างบริเวณข้อของลำไยพันธุ์ดอในสภาพสวนธรรมชาตินำมาตัดใบอ่อนออกให้เหลือส่วนยอดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แล้วนำมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.5 Teepol แล้วล้างโดยผ่านน้ำประปานาน 15 นาที นำไปแช่ใน 70% ethanol นาน 1 นาที ย้ายไปแช่ใน 10 % clorox ผสม Tween 20 2-3 หยด นาน 10-15 นาที เช้าเป็นครั้งคราวแล้ว ล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษ กรองหนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อฝังให้แห้งพอหมาด จากนั้นตัดเอาเฉพาะส่วนตาข้างบริเวณข้อ

เก็บใบอ่อนจากต้นลำไยในสภาพสวนธรรมชาตินำมาฟอกฆ่าเชื้อผิวด้วย 0.5 % Teepol นาน 1 - 2 นาที แล้วแช่ใน 5 % Clorox ผสม Tween 20 2-3 หยด นาน 10 นาที เช้าเป็นครั้งคราวแล้วล้างน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อฝังให้แห้ง แล้วตัดขอบใบออกทุกด้าน เอาเฉพาะส่วนที่ติดกับเส้นกลางใบ

เก็บเมล็ดลำไยพันธุ์ดอ มาแกะแยกเปลือกและเนื้อลำไยออก แล้วล้างด้วยน้ำประปาโดยให้น้ำไหลผ่าน 15 นาที แล้วแช่เมล็ดลงใน 95 % ethanol นาน 1 นาที ย้ายไปแช่ลงใน 2.5% Clorox ผสม Tween 20 2-3 หยด นาน 3 นาที แล้วกลับมาแช่ 95 % ethanol นาน 30 วินาที นำมาวางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองหนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อฝังให้แห้งพอหมาด ผ่านเมล็ดลำไยแล้วควักเอาเนื้อในมาวางบนอาหาร

นำชิ้นส่วนพืชที่ได้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS+ NAA 5 mg/l + Kinetin 2.5 mg/l + sucrose 40 g/l + 15 % coconut milk + 8 g/l agar pH 5.8

7. การเพาะเลี้ยงส่วนตาข้างบริเวณข้อและเมล็ดของลำไยจากต้นพันธุ์จากสภาพสวนธรรมชาติ และการลดปริมาณการสร้าง phenolic compound

ตัดส่วนตาข้างบริเวณข้อของลำไยพันธุ์ดอ มาตัดใบอ่อนออกให้เหลือส่วนของข้อยาวประมาณ 2 ซม. หลังทำการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วนำ ชิ้นพืชที่ได้ ไปแช่ในสารกำจัดเชื้อรา benomyl (Benlate OD) โดยแบ่งแช่เป็นเวลานาน 10 นาที , 1/2 ชั่วโมง และ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นตัดเอาเฉพาะ ส่วนยอด สำหรับนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร 2 สูตรได้แก่

สูตร A อาหารสูตร MS + sucrose 30 g/l + BA 1 mg/l : เติม 0.01 % ascorbic acid

สูตร B อาหารสูตร MS + sucrose 30 g/l + BA 1 mg/l + เติม 0.25 % PVPP

(PVPP = polyvinyl polypyrrolidone)

ทั้งสองสูตรอยู่ในรูปของอาหารแข็ง โดยเติมวุ้น 0.8 % agar ใส่ในขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 10 มิลลิลิตร ทำการบันทึกผล

ผลการทดลอง

1. ผลการคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้ใช้สูตรอาหารของ Murashige และ Skoog (MS) และนำมาปรับความเข้มข้นของสารกระตุ้นการเจริญเติบโตชนิดต่าง ๆ การเตรียมสารละลาย stock และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต แสดงไว้ใน (Table 117)
2. ผลการทดลองเพาะเลี้ยงเมล็ดลำไยพันธุ์ดอภายใต้สภาพปลอดเชื้อ พบว่าเมล็ดลำไยที่สมบูรณ์ มีการงอกเป็นต้นอ่อนหลังจากเพาะเมล็ดบนอาหารวุ้นภายใน 2 สัปดาห์ จากนั้นต้นอ่อนเจริญเป็นต้นกล้าที่สมบูรณ์ ภายใน 45 วัน (Figure 127)
3. ผลการศึกษาการเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อใบ ลำต้น และราก บนอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่ประกอบด้วย kinetin 0.1 mg/l และ 2,4-D 1.0 mg/l และอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 0.1 mg/l และ NAA 1.0 mg/l พบว่าส่วนของใบอ่อนและลำต้นมีการเจริญเกิดเป็นแคลลัส (callus) ในสูตรอาหาร MS ที่ประกอบไปด้วยสารควบคุมการเจริญเติบโตทั้ง 2 สูตรแคลลัสพบเกิดขึ้นปริมาณน้อยที่บริเวณรอยตัดของส่วนใบและลำต้น ขณะที่ส่วนรากไม่พบการเกิดแคลลัส ในอาหารพื้นฐานสูตร MS ประกอบด้วย BA 1.0 mg/l และ kinetin 0.5 mg/l พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นเฉพาะส่วนของลำต้น (Figure 128) ส่วนใบและรากไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ผลจากการทดลองนี้ได้เลือกใช้ส่วนใบและลำต้น ใช้ทำการทดลองกับสูตรอาหารต่างๆ
4. ผลการเจริญและการพัฒนาของส่วนใบและลำต้นบนอาหารชนิดต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใบและลำต้นบนอาหารสูตร MS ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดและความเข้มข้นของสารควบคุมการเจริญเติบโตรวม 75 สูตรพบว่าหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของส่วนใบ เมื่อเลี้ยงบนอาหารหลายสูตร แต่พบในอาหารบางสูตรที่มีการสร้างแคลลัสและรากเกิดขึ้น ในขณะที่ไม่พบการพัฒนาของยอดเกิดขึ้นจากส่วนใบ แคลลัสจะเกิดขึ้นบริเวณรอยตัดของส่วนใบแต่ไม่เจริญเป็นแคลลัสที่สมบูรณ์ สูตรอาหารที่สามารถชักนำให้สร้างแคลลัสและเจริญเพิ่มปริมาณได้แก่ สูตร MS ที่ประกอบไปด้วย kinetin 1.5 mg/l และ NAA 1.0 mg/l สูตรอาหารที่ทำให้เกิดรากจำนวนมากจากส่วนใบ ได้แก่สูตร MS ที่ประกอบด้วย NAA 0.5 mg/l และ สูตร MS ที่ประกอบด้วย kinetin 0.1 mg/l และ NAA 0.5 mg/l
5. ผลของ BA และ Kinetin ต่อการชักนำให้เกิดยอด พบว่า ส่วนตาเป็นส่วนของพืชที่เหมาะสมสามารถนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดยอดจำนวนมาก เพื่อทำการขยายพันธุ์ต้นลำไยปลอดโรคโดยอาหารที่ใช้ได้ผลคือ สูตร MS ที่ประกอบด้วย BA 1.0 mg/l หรือ kinetin 0.5 mg/l สามารถชักนำให้เกิดยอดได้จากส่วนของตาข้างบริเวณข้อ (Figure 129)

จากผลการทดลองข้างต้น เป็นการทดสอบผลของอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชต่อการเจริญและการพัฒนาของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไยที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อเท่านั้น เพื่อใช้เป็นแนวทางการศึกษาและทดลองพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัส ยอด และรากจากส่วนต่างๆ ของลำไย โดยนำชิ้นส่วนต่างๆ ของต้นลำไยจากสภาพธรรมชาติ มาทดสอบ

6. ผลจากการนำชิ้นส่วนของตาข้างบริเวณข้อ ใบอ่อนและเมล็ดลำไยจากสภาพสวนตามธรรมชาติ มาเลี้ยงบนอาหาร พบว่ามีสารสีน้ำตาลออกม่วงผลิตขึ้นมารอบๆ ชิ้นส่วนพืช โดยละลายปนลงในอาหารวุ้นซึ่งสารดังกล่าวซึมลงในวุ้นด้านล่าง สารที่เกิดขึ้นเป็น phenolic compound ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 24-48 ชั่วโมงหากมีปริมาณมากจะทำให้ไปยับยั้งกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์พืชเอง จำเป็นต้องย้ายชิ้นพืชจึงสามารถลดปริมาณสารลงได้ในการสร้างแคลลัสใช้เวลานานแต่อาหารสูตรนี้สามารถสร้างรากได้แข็งแรงและได้ปริมาณมาก นอกจากนี้ยังพบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราที่มีลักษณะเป็น endophyte เกิดขึ้นกับชิ้นพืชหลังจากเลี้ยงไว้ประมาณ 3 สัปดาห์ แต่จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจากสูตรอาหารนี้ สามารถชักนำให้ส่วนของตาข้างบริเวณข้อเจริญได้รากที่สมบูรณ์และมีปริมาณมาก (Figure 130)
7. ผลจากการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนตาข้างและเมล็ดของลำไยบนอาหารทั้งสองสูตร และแช่ในสารฆ่าเชื้อราในเวลาต่างๆ กัน พบว่า การสร้างสาร phenolic compound จากชิ้นพืชมีปริมาณลดน้อยลงจากที่ไม่เคมีสารดังกล่าว แต่บางชิ้นพืชจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและมีการสร้างแคลลัสได้ในปริมาณน้อย ในบางชุดของการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงไปประมาณ 3 สัปดาห์ มีเส้นใยเชื้อราเจริญขึ้นคลุมชิ้นพืช ซึ่งเชื้อราที่เกิดขึ้นเป็นกลุ่มของ endophytic fungi ที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์พืช ไม่สามารถกำจัดได้ในขั้นตอนการฟอกเชื้อที่ผิว จึงปรากฏออกมาให้เห็นในภายหลัง

Table 118. Chemical ingredients of Murashige and Skoog medium

สารเคมี	ความเข้มข้นของสารใน stock solution	ปริมาณของ stock solution ที่ใช้เตรียมสารละลาย (1,000 ml)	การเก็บ stock solution
Stock 1 (Macronutrients)	g/1,000 ml	50 ml	เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °c
NH ₄ NO ₃	33.0		
KNO ₃	38.0		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.4		
KH ₂ PO ₄	3.4		
Stock 2 (Micronutrients)	mg/100 ml	1 ml	เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °c
H ₃ BO ₃	620		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,230		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5		
Stock 3 (Ca stock)	g/100 ml	5 ml	เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °c
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8.7		
Stock 4 (KI stock)	mg/100 ml	1 ml	ใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็น 4 °c
KI	75		
Stock 5 (Vitamins)	mg/100 ml	5 ml	ใส่ขวด(ปริมาตร 10 ml) เก็บในห้องแช่แข็ง -20 °c
Myo-Inositol	2,000		
Nicotinic acid	10		
Pyridoxine-HCl	10		
Thiamine-HCl	10		
Glycine	40		
Stock 6 (Fe-EDTA stock)	g/500 ml	5 ml	เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °c
Na ₂ EDTA	3.73		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78		
Auxin, Cytokinin and Gibberellin stock solution	mg/100 ml	ถ้าต้องการความเข้มข้น 1 mg/l ในอาหาร 1 ลิตร ใช้ 10 ml	เก็บไว้ในตู้เย็น 4 °c
2,4-D, IAA หรือ NAA	10		
kinetin หรือ BA	10		
GA ₃	10		

Table 118. Selective media for longan organ differentiations

ส่วนของพืชที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	ส่วนที่พัฒนาได้	สูตรอาหาร	pH	Suc./Glu. (g/l)	Agar (g/l)	อัตราของสารควบคุม การเจริญ(mg/l)	หมายเหตุ
เนื้อเมล็ด	พัฒนาแคลลัสและราก	Murashige & Skoog(1962)	5.8	30	8	(0.5) NAA + (2.5) kinetin	- สร้างสาร phenolic compound
ส่วนของลำใยจากการเพาะเมล็ด							
ปลอดเชื้อ							
- ใบอ่อน	พัฒนาแคลลัส	Murashige & Skoog(1962)	5.8	30	8	(1.0) NAA + (1.5) kinetin	- ใบที่ใช้ควรเป็นใบอ่อน
- ตาข้างบริเวณข้อ	พัฒนายอด	Murashige & Skoog(1962)	5.8	30	8	(1.0) BA / (0.5) kinetin	- เติบโตอาหารทั้งสองสูตร รวมกันจะไม่เกิดยอด
- ลำต้น	พัฒนาแคลลัสและราก	Murashige & Skoog(1962)	5.8	30	8	(5.0) NAA + (2.5) kinetin	- รากได้จำนวนมากและแข็งแรง
ส่วนของลำใยที่ได้จากสภาพธรรมชาติ							
- ตาข้างบริเวณข้อ	พัฒนาแคลลัสและราก	Murashige & Skoog(1962)	5.8	40	8	(5.0) NAA + (2.5) kinetin + 15% coconut milk	- ได้รากจำนวนมากและสมบูรณ์ แต่สารพวก phenolic compound ปริมาณสูง
- ตาข้างบริเวณข้อ	พัฒนาแคลลัสไม่โต	Murashige & Skoog(1962)	5.8	30	8	(1.0) BA + 25% PVPPP	- เกิด endophyte และไม่สร้างแคลลัส

^a สูตรอาหารของการเลี้ยงเนื้อเยื่อลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) ที่ศึกษาโดย Edwin *et al.* (1987)



Figure 127. Longan seedling produced in sterile conditions.



Figure 128. Cellus formation from longan stem on MS medium contained 1.0 mg/l BA and 0.5 mg/l kinetin.



Figure 129. Initiation of shoot from lateral bud of longan stem on MS medium contained 1.0 mg/l or 0.5 mg/l kinetin.



Figure 130. Initiation of root from lateral bud of longan on MS medium contained 5.0 mg/l NAA, 2.5 mg/l kinetin and 15 % coconut milk.

สรุปผลการทดลอง

การทดลองเพาะเมล็ดลำไยสภาพปลอดเชื้อบนอาหารวุ้น พบว่าเมล็ดใช้เวลาออกเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และได้ลักษณะต้นกล้าที่สมบูรณ์แข็งแรงเหมาะกับการนำไปใช้ทดสอบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากส่วนต่าง ๆ บนอาหาร เมื่อลำไยมีอายุประมาณ 45 วัน

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของต้นลำไยบนอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนของตาข้างบริเวณข้อ สามารถนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุดในอาหารสูตร MS+1.0mg/l BA+0.5mg/l kinetin + 30 g/l sucrose/glucose ที่ pH 5.8 แล้วจึงทำการย้ายแคลลัสที่ได้ลงในสูตรอาหาร MS+1.0 mg/l BA หรือ 0.5mg/l kinetin + 30 g/l sucrose/glucose ที่ pH 5.8 เพื่อชักนำให้เกิดยอดได้จำนวนมาก และทำการพัฒนาให้เกิดรากที่สมบูรณ์ได้ในสูตรอาหาร MS+5.0 mg/l NAA+2.5 mg/l kinetin + 15% coconut milk +40 g/l sucrose/glucose ที่ pH 5.8 นอกจากนี้ยังมีสูตรอาหารอื่น ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลำไยภายใต้สภาพปลอดเชื้อ คือ สูตร MS ที่ประกอบด้วยสารกระตุ้นการเจริญซึ่งปริมาณและชนิดที่ใช้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของพืชที่นำมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Table 118) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในครั้งนี้ยังไม่สามารถหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส ยอดและรากกลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายในสูตรอาหารชนิดเดียวกันได้

จากการนำชิ้นส่วนของตาข้างจากต้นลำไยในสภาพธรรมชาติ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็น callus ได้เช่นเดียวกับชิ้นส่วนที่ได้จากต้นกล้าลำไยในสภาพปลอดเชื้อ แต่จะพบปัญหาชิ้นพืชมีการสร้างสาร phenolic compound ออกมามาก เนื่องจากในพืชที่แก่จะมีการผลิตสารนี้ออกมามากซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวเองของพืชตามธรรมชาติ และสารนี้ก็มีผลยับยั้งต่อการพัฒนาของแคลลัส การแก้ปัญหาอย่างหนึ่งคือการย้ายชิ้นพืชไปลงในอาหารใหม่จนกระทั่งสารนี้หมดไป และจากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการพัฒนาสูตรอาหารโดยเติมสาร PVPP และ ascorbic acid ซึ่งพบว่าสามารถลดปริมาณการสร้างสารนี้ได้ผล และปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่เกิดกับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของลำไยที่มาจากสภาพธรรมชาติคือ เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำไยไประยะหนึ่งจะเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราแฝงอยู่ภายใน (endophytic fungi) ในภายหลัง ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติและแฝงอยู่ภายในเนื้อเยื่อของลำไย ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อนี้ได้จากกรรมวิธีในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของชิ้นส่วนที่นำมาเพาะเลี้ยงได้ การแก้ปัญหาคือ การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของพืชในการเพาะเลี้ยงของแต่ละชุดทดลองให้มากขึ้น หรือทำจำนวนซ้ำมากขึ้นเพื่อมีโอกาสที่จะได้ชิ้นส่วนที่เชื้อรายังเจริญเข้าไปไม่ถึง รวมทั้งเป็นการคัดเลือกชิ้นส่วนที่รอดจากการเข้าทำลายของเชื้อราที่แฝงอยู่ภายในเซลล์พืช ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของลำไยให้ประสบผลสำเร็จจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น รวมทั้งการปรับปรุงและพัฒนาองค์ประกอบต่าง ๆ ของสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมอีกต่อไป เพื่อที่จะสามารถผลิตต้นพันธุ์ลำไยจำนวนมากที่ได้จากแหล่งพันธุ์ที่ดีและปราศจากโรค

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา วิชิตระกูลถาวร. 2536. การใช้กรรมมือโกชนในการตรวจเชื้อราบนใบมะม่วง. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 29 หน้า.
- จริยา วิสิทธิ์พานิช. 2528. ไโรกระเทียม. แม่โจ้เทคโนโลยีการเกษตร. 8:16-19.
- จันทร์จิรา เชิงคา. 2541. การวิเคราะห์พันธุกรรมของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) โดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA. . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 65 หน้า.
- จวีวรรณ หุตะเจริญ. 2533. แมลงศัตรูป่าไม้ของไทย. แสงเทียนการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 171 หน้า.
- นงลักษณ์ ศรีนทุ. 2536. งานวิจัยเกี่ยวกับโรคมายโคพลาสมาพืชในประเทศไทย ในเอกสารเผยแพร่วิชาการ โรคพืชและจุลชีววิทยา ประจำปี 2536. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- นวลจันทร์ ดีมา สมบูรณ์ เจริญฤทธิ์ ไมตรี พรหมมินทร์ และสุรภี ผลอำนวย. 2519. การศึกษาวิธีการถ่ายทอดโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย กองวิจัยโรคพืช กองเกษตรเคมีกรมวิชาการเกษตร. หน้า 10 – 11.
- นิวัฒน์ เสนาะเมือง นิพนธ์ ทวีชัย และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2523. ผลของเตรตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำร้อนต่อเชื้อมายโคพลาสมาในอ้อยเป็นโรคใบขาว. ใน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 13 (5) : 473 – 477.
- ปริญญ์ จันทศรี อภิญญา แซ่เต็ง วิชา สอดสุด และชาตรี สิทธิกุล. 2538. การเปลี่ยนแปลงปริมาณประชากรของเชื้อราบนผิวใบลำไยและความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนผลลำไย. เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 2. ณ โรงแรมเพชรงาม จังหวัดเชียงใหม่. 9 – 11 ตุลาคม 2538. หน้า 198 – 207.
- ประสาทร สมิตะมาน. 2516. การแยกเชื้อและการศึกษาทาง ultrastructure ของเชื้อ mycoplasma จากลำไยที่เป็นโรค witches' broom. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 67 หน้า
- พัฒนา สนธิรัตน์ ประไพศรี พิทักษ์ไพรวรรณ ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิ์รงค์ วิรัช ชูบำรุง และอุบล คือประโคน. 2537. ธรรมชาติโรคพืชในประเทศไทย. ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 3 กลุ่มงานวิทยาไมโคร กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 285 หน้า.
- วิจัย ก่อประดิษฐ์สกุล อติศักดิ์ บัณฑิตยานันท์ ชีระ สุตะบุตร และฉลองชัย แบบประเสริฐ. 2521. การศึกษาขั้นต้นเกี่ยวกับการถ่ายทอดและการรักษาโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 11:241– 246.
- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2526. แมลงศัตรูพืชทางการเกษตรของประเทศไทย. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 424 หน้า.

- สุรัชย์ มัจฉาชีพ. 2535. พืชเศรษฐกิจในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แพรวพิตยา.
- เสนห์ ชุมแสน. 2530. การสำรวจและการแยกเชื้อราจากผลลำไยที่เป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยว. ปัญหาพิเศษ
หลักสูตรปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 45 หน้า.
- เสาวรัตน์ คุณขยั้ง. 2533. โรคใบม้วนหงิกและผลของโรคที่มีต่อผลลำไยพันธุ์ดอกล่อนและหลังเก็บเกี่ยว.
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 182 หน้า.
- Adato, A., D. Sharon, U.Lavi, J. Hillel, and S. Gazit. 1995. Application of DNA fingerprints for
identification and genetic analysis of Mango (*Mangifera indica*) genotypes. Journal of
American Society Horticultural Science. 120 (2): 259 – 264.
- Albrigo, L.G., and C.W. McCoy. 1974. Characteristics in injury by citrus rust mite to orange leaves
and fruit. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 87 : 48-55.
- Allen, J.C., and C.W. McCoy. 1979. The thermal environment of the citrus rust mite. Agric. Meteorol.
20: 411-425.
- Allen, J.C., Y. Yang and J.L. Knapp. 1995. Temperature effects on development and fecundity of the
citrus rust mite (Acari : Eriophyidae). Environ. Entomol. 24 : 996-1004.
- Amusa, N.A. 1994. Production, partial purification and bioassay of toxic metabolites of three plant
pathogenic species of *Colletotrichum* in Nigeria. Mycopathologia 128 : 161–166.
- Beeson, C. F. G. 1941. The Ecology and Control of the Forest Insects in India and Neighboring Countries.
Government Printing Office, Madras. 767 pp.
- Belaizi, M., H. Paul, R. S. Sangwan and B. S. Andangwan-Norreel. 1991. Direct organogenesis
from internodal segment of *in vitro* grown shoot of apple cv. Golden delicious.
Plant Cell Rep. 9:471-474.
- Cerkauskas, R.F. and J.B. Sinclair. 1980. Use of paraquat to aid detection of fungi in soybean
tissues. Phytopathology 70: 1036-1038.
- Chai, J.K. and Y.H. Kim 1989. Studies on witches' broom of *Ligustrum ovalifolium* Hasskarl. caused by
mycoplasma like organism (MLO). Journal of Korean Forestry Society. 78 : 2, 103 – 118.
- Coetzee, J.H., D.J. Rust and L.M. Latsky. 1986. Mites (Acari) on proteas. Acta-Horticulturae.
180: 247 – 251.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12 (1) : 13 – 15.
- Edwin, G. F., J. M. David and G. J. Heather. 1987. Plant Culture Media. Edington, Westbury,
England p. 106.

- Emmanouel, N.G. and G.T. Papadoulis. 1987. *Panonychus citri* Mc Gregor (Tetranychidae) and *Eriophyes medicaginis* K. (Eriophyidae) : two important phytophagous mites recorded for the first time in Greece. *Entomology Hellenica*. 5 (1) : 3 – 6.
- Grosser, J. W. and J. L.Chandler 1991. *in vitro* multiplication of swingle citromelo root stock with coumarin. *Hort. Science*. 21(3): 518-520.
- Haegi, A. and A. Porta- Puglia. 1995. Purification and partial characterization of a toxic compound produced by *Pyrenophora graminea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46 : 429 – 444.
- Hartman, G.L., J.B. Manandhar and J.B. Sinclair. 1986. Incidence of *Colletotrichum* spp. on soybeans and weeds in Illinois and pathogenicity of *Colletotrichum truncatum*. *Plant Dis.* 70 : 780 – 782.
- Holloway, D. S. 1986. The Moth of Borneo' s Key to Families : Family Cossidae, Metarbelidae, Ratardidae, Dudgeoneridae, Epipyropidae and Limacodidae. *Malaysia Naturl Journal* 40: 1-116.
- Keifer, H.H. and L.C. Knorr. 1978. Eriophyid mites of Thailand. *Pl. Prot. Tech. Bull.* No. 38. Department Agriculture Bangkok. (UNDP/FAO THA 74/019)
- Licha-Baquero, M. 1980. The witches' broom disease of pigeonpea(*Cajanus cajan* L.) in Puerto Rico caused by mycoplasma like organism and virus, Empoascu vectors. *The Journal of Agriculture of the university of Puerto Rico, Agricultural Experiment station*. 64 (4) : 441 – 442.
- Litz, R. E. and R. A. Conover. 1978. *in vitro* propagation of papaya. *Hort Science*. 13 (3) : 241 - 242.
- Mansom, D.C.M., and G.N. Oldfield. 1996. Biology and ecology. P. 173-183. *In* E.E. Lindquist, M.W. Sabelis, and J. Bruin (eds.), *Eriophyoid mites : Their biology, natural enemies and control*. Elsevier Science Publ., Amsterdam.
- Oldfield, G.N. 1996. Toxemias and other non-distortive feeding effects. P. 243-250. *In* E.E. Lindquist, M.W. Sabeles, and J. Bruin (eds.), *Eriophyiod mites : Their biology, natural enemies and control*. Elsevier Science Publ., Amsterdam.
- Oldfield, G.N., R.F. Hobza and N.S. Wilson. 1970. Discovery and characterization of spermatophores in the Eriophyidea (Acari). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63 : 520-526.
- Pena, J.E., and R.M. Baranowski. 1990. Dispersion indices and sampling plans for the broad mite (Acari : Tarsonemidae) and the citrus rust mite (Acari : Eriophyidae) on limes. *Environ. Entomol.* 19 : 378-382.
- Petersen, R.G. 1994. Combined Analysis of Several Experiment p. 205-260. *In* *Agricultural Field Experiments Design and Analysis*. Maral Dekker, Inc., New York.

- Rahman, M. A. and J. Blake. 1988. Factors affecting *in vitro* proliferation and rooting of shoots of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Plant cell. Tissue and Organ Culture 13: 179-187.
- Royalty, R.N., and T.M. Perring. 1996. Nature of damage and its assessment. p. 493-512. In E.E. Lindquist, M. W. Sabelis, and J. Bruin (eds.), Eriophyoid mites : Their biology, natural enemies and control. Elsevier Science Publ., Amsterdam.
- Schaad, N.W. 1986. Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Bacteriology Committee of American Phytopathological society St. Paul, Minnesota. 245 p.
- Sternlicht, M. 1970. Contribution to biology of the citrus bud mite, *Aceria sheldoni* (Ewing) (Acarina : Eriophyidae). Ann. Appl. Biol. 65 : 221-230.
- Sternlicht, M. and S. Goldenberg. 1971. Fertilization, sex ratio and post-embryonic stages of the citrus bud mite *Aceria sheldoni* (Ewing) (Acarina : Eriophyidae). Bull. Entomol. Res. 60 : 391-397.
- Sun, Xm., F.W. Zhang and X.D. Tian 1988. Study on the biology and control of *Hishimonus sellatus* Uhler. a vector of jujube witches' broom. Acta Phytophylactica Sinica. 15 (3) : 173 – 177.
- Vite, G.M. 1961. The influence of water supply on oleoration exudation pressure and resistance bark beetle attack in *Pinus pondorasa*. Contrib. Boyce Thompson Inst. 21: 37-66.
- Weising, K., B. Beyermann, J. Ramser and G. Kahl. 1991. Plant DNA fingerprinting with radioactive and digoxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequence. Electrophoresis. 12 : 159 – 169.
- Yang, Y., J.C. Allen, J.L. Knapp and P. A. Stansly. 1995. Frequency distribution of citrus rust mite (Acari : Eriophyidae) damage on fruit in Hamlin orange trees. Environ. Entomol. 24 : 1018-1023.
- Yiem, M.S., Y.S. Kim and M.S. Kim. 1988. Studies on the control and binomics of rhombic-marked leafhopper (*Hishimonus sellatus* Uhler.) vector of jujube witches' broom mycoplasma. Research Reports of the Rural Development Administration, Horticulture.

ภาคผนวก

การนำผลงานไปใช้

1. การฝึกอบรมประชุมสัมมนา

1. วันที่ 11-12 มิถุนายน 2540 ได้ร่วมประชุมจัดทำโครงการแก้ไขปัญหาระบาดของลำไยร่วมกับศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ณ โรงแรมเพชรงาม จังหวัดเชียงใหม่
2. วันที่ 29 มิถุนายน 2540 เข้าร่วมประชุมวางแผนการตลาด และเสวนาเกี่ยวกับการวิจัยลำไยร่วมกับเกษตรกร นักธุรกิจ ข้าราชการ และนักวิชาการ ที่ศูนย์ตาลเนเจอร์แลนด์ อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน
3. วันที่ 24 กรกฎาคม 2540 ร่วมประชุมสัมมนา เรื่องการปลูกลำไยโดยวิธีธรรมชาติ ร่วมกับชมรมเกษตรกรธรรมชาติประเทศไทย กรมส่งเสริมการเกษตร สมาคมชาวสวนลำไย และคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4. วันที่ 4-6 พฤศจิกายน 2540 เป็นวิทยากรบรรยาย เรื่องแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไย และการฝึกอบรมหลักสูตร “การผลิตลำไยและลำไยในเทคโนโลยียุคใหม่” จัดโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาไม้ผลเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนร่วมกับสำนักงานส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ณ โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ จังหวัดเชียงใหม่
5. วันที่ 23 ธันวาคม 2540 เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “โรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไยและการป้องกันกำจัด” จัดโดย คณะกรรมการสมาชิกชมรมชาวสวนลำไย และสำนักงานเกษตรอำเภอฝาง ณ ห้องประชุมโรงเรียนชุมชนบ้านป่าไผ่ หมู่ที่ 1 ตำบลป่าไผ่ อำเภอฝาง จังหวัดลำพูน
6. วันที่ 8-9 มกราคม 2541 ประชุมในงานความก้าวหน้าชุดโครงการไม้ผลและผลิตภัณฑ์จากผลไม้ โรงแรมมารวยการ์เด็น กรุงเทพฯ (เอกสารประกอบการประชุม 1)
7. วันที่ 24 เมษายน 2541 เป็นวิทยากร บรรยายเรื่อง “แมลงศัตรูไม้ผล และการป้องกันกำจัด” ใน การฝึกอบรมเจ้าหน้าที่เกษตรกรจากสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ณ โครงการศูนย์วิจัยและพัฒนากาแฟบนที่สูง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8. วันที่ 16 กันยายน 2541 เป็นวิทยากร บรรยายเรื่องโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไย ในการสัมมนาวิชาการ เรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตลำไยครบวงจร” ระหว่างวันที่ 15-17 กันยายน 2541 ณ โรงแรมเชียงใหม่ภูคำ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จัดโดยสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรที่ 1 กรมวิชาการเกษตร
9. วันที่ 18-19 ธันวาคม 2541 ประชุมรายงานความก้าวหน้าชุดโครงการไม้ผล และผลิตภัณฑ์จากผลไม้ ครั้งที่ 2 ณ โรงแรมอมรินทร์ลาดหญ้า จังหวัดพิษณุโลก (เอกสารประกอบการประชุม 2)
10. วันที่ 26 เมษายน 2542 เป็นวิทยากรบรรยาย เรื่อง “โรคหอยของลำไย” ร่วมกับชมรมผู้ปลูกลำไยแห่งประเทศไทย ณ ห้องประชุม สุขุม อัสเวศน์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ (เอกสารประกอบการประชุม 3)
11. วันที่ 8 กรกฎาคม 2542 เป็นวิทยากร บรรยาย เรื่อง การป้องกันกำจัดโรคหอยของลำไย ในการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง “การป้องกันและกำจัดโรคหอยของลำไย” ณ โรงแรมสอเลิศการ์เด็น อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จัดโดยสำนักงานส่งเสริมเกษตรภาคเหนือ จังหวัดเชียงใหม่ และกองป้องกันและกำจัดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร
12. วันที่ 19-21 กรกฎาคม 2542 เข้าร่วมประชุม “ การวางแผนวิจัยและยุทธศาสตร์พัฒนาลำไย” จัดโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ณ โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ จังหวัดเชียงใหม่ (เอกสารประกอบการประชุม 4)
13. วันที่ 19 สิงหาคม 2542 เป็นวิทยากร บรรยาย เรื่อง “โรคและแมลงศัตรูลำไย และการป้องกันกำจัด” ในการฝึกอบรมเจ้าหน้าที่ส่งเสริมฯ เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตลำไย ณ โรงแรมเพชรงาม อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

2. ผลงานที่ตีพิมพ์

1. การแพร่กระจาย และความเสียหายของลำไยที่เป็นโรคหอย ในจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ลงตีพิมพ์ในวารสารเกษตร ปีที่ 12 ฉบับที่ 2 หน้า 104-114. (2539) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 1)
2. ลักษณะความผิดปกติของใบลำไยที่แสดงอาการม้วนหงิกในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน ลงตีพิมพ์ในวารสารเกษตร ปีที่ 2 ฉบับที่ 3 หน้า 203-218. (2539) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 2)
3. อาการใบม้วนหงิกของลำไยสาเหตุจากไรและผลกระทบต่อผลผลิตลำไยพันธุ์ดอวารสารกัญและสัตววิทยา ปีที่ 20 ฉบับที่ 2 หน้า 89-103. (2541) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 3)

4. วงจรชีวิตของไรสีขา *Aceria dimocarpi* (Kuang) [Acarina : Eriophyidae] ศัตรูสำคัญของลำไย วารสารเกษตร ปีที่ 13 ฉบับที่ 1 หน้า 88-99. (2540) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 4)
5. ผลกระทบของโรคหงอยต่อผลผลิตลำไย วารสารโรคพืช ปีที่ 12 เล่มที่ 2 :108-113. (2540) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 5)
6. การ ตรวจสอบสมรรถนะของโรคหงอยลำไยเบื้องต้น วารสารโรคพืช ปีที่ 12 เล่มที่ 2: 114-122. (2540) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 6)
7. ไล่เดือนฝอยศัตรูพืชที่พบในสวนลำไยที่เป็นโรคหงอย วารสารเกษตร ปีที่ 14 ฉบับที่ 1 หน้า 3-9. (2541) (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 7)
8. Some new and interesting taxa of Boletales from tropical Asia จะตีพิมพ์ในวารสาร Fungal Science 1999. (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 8)
9. ศัตรูที่สำคัญของลำไยและแนวทางในการป้องกันกำจัด. ประมวลผลงานวิชาการด้านการเกษตร เนื่องในวโรกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 6 รอบ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 2542. หน้า 139-115. (เอกสารตีพิมพ์ในวารสาร 9)
10. หนังสือคู่มือคำแนะนำโรค และแมลงศัตรูลำไย. 2542. 102 หน้า. (เอกสารตีพิมพ์ (คู่มือ) 10)

3. กิจกรรมอื่นๆ

1. เดือนธันวาคม 2539 จัดทำเอกสารเผยแพร่เรื่องยอดไหม้ของลำไย และแนวทางในการป้องกันกำจัดขึ้นต้นให้แก่เกษตรกร อำเภอฝาง จังหวัดลำพูน (เอกสารเผยแพร่ 1)
2. วันที่ 1 –12 สิงหาคม 2540 แสดงนิทรรศการมหกรรมลำไยโลก โดยจัดทำโปสเตอร์เสนอผลงานวิจัยของโครงการฯ เรื่องโรคและแมลง พร้อมทั้งตัวอย่างอาการโรคและแมลง ณ สนามกีฬา อำเภอเมือง จังหวัดลำพูน
3. วันที่ 11 –14 ธันวาคม 2540 จัดแสดงนิทรรศการงานวิจัยโครงการ 3 เรื่อง คือ
 1. อาการใบม้วนหงิกของลำไยสาเหตุจากไรและผลกระทบต่อผลผลิต
 2. ผลกระทบของโรคหงอยต่อผลผลิตของลำไย
 3. โรคยอดไหม้-ใบร่วง โรคใหม่ของลำไย (เอกสารเผยแพร่ 2)

ในงานเกษตรภาคเหนือครั้งที่ 1 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

พร้อมทั้งแจกบทความวิจัยดังกล่าวสำหรับผู้สนใจ

4. วันที่ 1 –10 สิงหาคม 2541 ร่วมจัดโปสเตอร์ แสดงผลงานวิจัยของโครงการ ฯ พร้อมทั้งตัวอย่างอาการโรค และแมลง เรื่อง โรคและแมลงศัตรูลำไย ในงานเทศกาลลำไย และของดีเมืองลำพูนประจำปี 2541 ณ สานักกีฬาจังหวัดลำพูน
5. วันที่ 15-17 กันยายน 2541 จัดโปสเตอร์ แสดงผลงานวิจัยโครงการ ฯ ในการสัมมนาวิชาการ เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตลำไยครบวงจร ณ โรงแรมเชียงใหม่ภูคำ จังหวัดเชียงใหม่
6. วันที่ 15-17 ตุลาคม 2541 จัดโปสเตอร์แสดงผลงานวิจัยของโครงการ ฯ ในการประชุมหัวหน้าโครงการวิจัย สกว. ประจำปี 2541 ณ โรงแรมริเจนท์ ซะอำ ประจวบคีรีขันธ์
7. ได้มีการนำผลงานวิจัยเผยแพร่ในสื่อต่าง ๆ
 - 7.1 เผยแพร่งานวิจัยใน ข่าวสารสาระไม้ผล ของสำนักงานกองทุนสนับสนุนผลงานวิจัย (สกว.)
 - กันยายน 2540 “โรคยอดไหม้ของลำไย” (เอกสารเผยแพร่ 3)
 - ธันวาคม 2540 “การแพร่กระจาย และความเสียหายของลำไยที่เป็นโรคหงอย ในจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน” (เอกสารเผยแพร่ 4)
 - มิถุนายน 2541 “พบไรเป็นพาหะนำโรคพุ่มแจ้ของลำไย” (เอกสารเผยแพร่ 5)
 - มิถุนายน 2541 “พบไส้เดือนฝอยศัตรูพืชในแหล่งปลูกลำไยที่แสดงอาการหงอย” (เอกสารเผยแพร่ 6)
 - สิงหาคม 2541 “จริงหรือที่ว่าเห็ดห้ำมาคั้นลำไยได้” (เอกสารเผยแพร่ 7)
 - 7.2 วันที่ 29 เมษายน 2541 วิทยุทัศน์รายการรากแก้วแห่งปัญญา ตอนลำไยปลอดโรค โทรทัศน์ช่อง 5 เวลา 21.05-21.10 น.
 - 7.3 หนังสือเกษตร ในหัวข้อ “จากแฟ้มงานวิจัยสู่เกษตรกร” ปีที่ 22 ฉบับที่ 3 เมษายน 2541 จำนวน 1 เรื่อง การแพร่กระจาย และความเสียหายของลำไยที่เป็นโรคหงอยในจังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน (เอกสารเผยแพร่ 8)
 - 7.4 หนังสือเกษตร ในหัวข้อ “จากแฟ้มงานวิจัยสู่เกษตรกร” ปีที่ 22 ฉบับที่ 9 กันยายน 2541 จำนวน 1 เรื่อง พบไรเป็นพาหะนำโรคพุ่มแจ้ของลำไย (เอกสารเผยแพร่ 9)
 - 7.5 หนังสือเกษตร ในหัวข้อ “จากแฟ้มงานวิจัยสู่เกษตรกร” ปีที่ 22 ฉบับที่ 10 ตุลาคม 2541 จำนวน 1 เรื่อง การควบคุมโรค และแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไย (เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 10)
 - 7.6 วันที่ 21 สิงหาคม 2541 แลกเปลี่ยนงานวิจัยโรค-แมลง ชุดโครงการไม้ผลและผลิตภัณฑ์จากผลไม้ ณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และจัดโปสเตอร์แสดงผลงานวิจัย จำนวน 10 โปสเตอร์

I กิจกรรมที่ได้วางแผนไว้

ตารางที่ 1. ผลที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากโครงการทุกระยะ 6 เดือน

กิจกรรม	Output
6 เดือนที่ 1 (1 ก.ย. 39-28 ก.พ. 40) 1. ศึกษาและติดตามแมลงและโรค 1.1 ศึกษาเกี่ยวกับโรค โดยเน้น โรคหงอย และ โรคพุ่มแฉ้ 1.2 ศึกษาเกี่ยวกับแมลงศัตรูลำไยที่สำคัญและแมลงอื่นที่เกี่ยวข้อง 1.3 ศึกษาปริมาณการแพร่กระจายและระดับความเสียหาย เนื่องจากอาการใบหงิก	1. ทราบชนิด ปริมาณ และการระบาดของโรคและแมลงศัตรูลำไยในพื้นที่ต่าง ๆ
6 เดือนที่ 2 (1 มี.ค. 40-30 ส.ค. 40) 1. ศึกษาการระบาดของแมลง 1.1 ศึกษาฤดูกาลระบาดของแมลงและไร ที่เป็นสาเหตุของอาการใบหงิก 1.2 ศึกษาประชากรของผีเสื้อหนอนเจาะลำไยในฤดูกาลต่าง ๆ 1.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวน ตัวเต็มวัย หนอน และดักแด้ของหนอนเจาะลำไยผล 2. ศึกษาการตรวจสอบโรคพุ่มแฉ้ 2.1 ศึกษาวิธีการในการวินิจฉัยโรคพุ่มแฉ้และโรคหงอย	1. ทราบการระบาดของแมลงศัตรูลำไยในช่วงฤดูกาลต่าง ๆ 2. ทราบสาเหตุการเป็นโรคพุ่มแฉ้
6 เดือนที่ 3 (1 ก.ย. 40-28 ก.พ. 41) 1. ศึกษาสภาพนิเวศวิทยาของศัตรูพืช 1.1 ติดตามแมลงและโรคที่มีความสำคัญในสวนลำไยอย่างต่อเนื่อง 1.2 ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการระบาดของโรคและแมลงทั้งในสภาพสวนและในห้องปฏิบัติการ 1.3 ศึกษาวงจรชีวิตของแมลงและโรคสำคัญ รวมทั้งศัตรูธรรมชาติ 2. หาวิธีการผลิตแอนติเซรุ่มสำหรับตรวจหา	1. ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดของโรคและแมลงในสวนลำไย 2. วิธีการผลิตแอนติเซรุ่มเพื่อตรวจสอบ MLO

MLO ในต้นอ่อน กิ่งตอน และ ต้นที่ปลูกในสวนทั่วไปพร้อมวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสม สะดวกและรวดเร็ว	
6 เดือนที่ 4 (1 มี.ค. 41-31 ส.ค. 41) 1. การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจเบื้องต้น 2. ศึกษาการผลิตลำไยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3. การศึกษาการบริหารศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน 3.1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสวนลำไย 3.2 ศึกษาผลของสารเคมีที่มีพิษน้อยต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูลำไย 3.3 ศึกษาการใช้ชีววินทรีย์เพื่อการควบคุมโรคและแมลงศัตรูลำไย	1. ทราบข้อมูลความเสียหายทางเศรษฐกิจเนื่องจากการระบาดของโรคและแมลง 2. ได้วิธีการผลิตต้นลำไยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3. มีแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูลำไยอย่างน้อย 3 โรค และแมลง 3 ชนิด
6 เดือนที่ 5 (1 ก.ย. 41-28 ก.พ. 42) 1. ดำเนินการบริหารศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน 1.1 เลือกวิธีการที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสวนลำไย 1.2 ฝึกอบรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่นักวิชาการและผู้ประกอบการ 2. ผลิตลำไยปลอดโรคเพื่อขยายพันธุ์ให้ชาวสวนไปปลูก	1. ได้คู่มือการจัดทำ Integrated Pest Management ของสวนลำไย 2. ได้ต้นพันธุ์ปลอดโรคที่ชาวสวนสามารถนำไปใช้ได้
6 เดือนที่ 6 (1 มี.ค. 42-31 ส.ค. 42) 1. สรุปผลงานวิจัยทั้งหมด 2. ตีพิมพ์งานวิจัยที่ได้ออกมา 3. เผยแพร่ผลงานวิจัยโดยวิธีต่าง ๆ	1. ได้รายงานการวิจัยเป็นรูปเล่ม 2. ผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ 3. ผลจากการวิจัยได้มีการปฏิบัติใช้โดยเกษตรกร

II กิจกรรมที่ดำเนินมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

กิจกรรม	Output	ได้ผลตามแผน (%)
6 เดือนที่ 1 (1 ก.ย. 39 - 28 ก.พ. 40) 1. ศึกษาและติดตามแมลง และโรค 1.1 ศึกษาเกี่ยวกับโรค โดยเน้นโรคหอย และโรคพุ่มแจ้ 1.2 ศึกษาเกี่ยวกับแมลงศัตรูลำไยที่สำคัญ และแมลงอื่นที่เกี่ยวข้อง 1.3 ศึกษาปริมาณการแพร่กระจาย และระดับความเสียหาย เนื่องจากการไอบหึง	1. ทราบชนิด และปริมาณการระบาดของโรค และแมลงศัตรูลำไยในพื้นที่ต่าง ๆ (เชียงใหม่ 15 สวน ลำพูน 28 สวน) 1.1 -โรคหอยพบความเสียหาย 33-41 % -โรคพุ่มแจ้พบความเสียหาย 9-16 % 1.2 -ความเสียหายจากหนอนกิน เปลือกลำต้นพบ 20-29 % -ต้นที่เสียหายจากหนอนด้วงหนวขาวเจาะกิ่ง และลำต้น 19 % -ต้นลำไยที่ถูกหนอนกัดกินใบเข้าทำลาย 40-75 % -ต้นลำไยที่เป็นโรคยอดไหม้ใบร่วงที่อำเภอดี้ 96 % -พบเพลี้ยหอยตามกิ่งลำไย 2 % -ต้นลำไยเป็นโรคกิ่งปม 9 % 1.3 อาการไอบหึงจากสารกำจัดวัชพืช พบ 2-23 %	100 %
6 เดือนที่ 2 (1 มี.ค. 40-31 ส.ค. 40) 1. ศึกษาการระบาดของแมลง 1.1 ศึกษาฤดูกาลระบาดของแมลง และไร ที่เป็นสาเหตุของอาการไอบหึง 1.2 ศึกษาประชากรของผีเสื้อ หนอนเจาะหัวในฤดูกาลต่างๆ 1.3 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตัวเต็มวัย หนอน และดักแด้ของหนอนเจาะหัวผล 2. ศึกษาการตรวจสอบโรคพุ่มแจ้ 2.1 ศึกษาวิธีการในการวินิจฉัยโรคพุ่มแจ้ และโรคหอย	1. ทราบการระบาดของโรค-แมลงศัตรูลำไย ในช่วงฤดูกาลต่าง ๆ 1.1 ปริมาณไรพบมากในช่วงลำไยแทงช่อดอก ในเดือนมีนาคม-เมษายน และพบระบาดอีกครั้งในเดือนกรกฎาคม ซึ่งเป็นช่วงลำไยแตกใบอ่อนเป็นส่วนใหญ่ 1.2 ผีเสื้อของหนอนเจาะหัวผลที่ดักได้จากกับดักแสงไฟมีปริมาณน้อย โดย เริ่มพบเข้าในเดือนมีนาคม 1.3 ปริมาณของตัวเต็มวัยที่ดักได้จากกับดักแสงไฟมีน้อยมาก จึงไม่สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนตัวเต็มวัย หนอน และดักแด้ของหนอนเจาะหัวผลได้ 2. ทราบสาเหตุการเป็นโรคพุ่มแจ้ 2.1 สาเหตุของโรคพุ่มแจ้ เกิดจากการดูดกินบริเวณยอดอ่อน และช่อดอกของไรสีขา <i>Aceria dimocarpis</i> Kuang และจากการตรวจดูเนื้อเยื่อจากยอดพุ่มแจ้ที่มีไรดูดกิน ด้วยกล้องจุลทรรศน์	75 %

	อิเล็กทรอนิกส์ พบลักษณะคล้ายเซลล์ของเชื้อโรค Phytoplasma 2.2 สาเหตุของโรคหงอยในเบื้องต้น คาดว่า อาจเกิดจากการขาดธาตุอาหาร และมีโรค-แมลงเข้าทำลายซ้ำเติมจึงได้เริ่มฟื้นฟูสภาพต้นลำไยที่ทรุดโทรมในที่คอน 1 แห่ง และที่ลุ่ม 3 แห่ง ตั้งแต่เดือนเมษายน 2540 กำลังอยู่ในระยะติดตามผล	
6 เดือนที่ 3 (1 ก.ย. 40-28 ก.พ. 41) 1. ศึกษาสภาพนิเวศวิทยาของศัตรูพืช 1.1 ติดตามแมลง และโรคที่มี ความสำคัญในสวนลำไยอย่าง ต่อเนื่อง 1.2 ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการระบาดของโรค และแมลงทั้งในสภาพสวน และในห้องปฏิบัติการ 1.3 ศึกษาวงจรชีวิตของแมลง และโรคสำคัญรวมทั้งศัตรูธรรมชาติ	1. สภาพภูมิอากาศที่เปลี่ยนแปลงโดยมีอากาศร้อน และแห้งแล้งกว่าปีที่ผ่านมาทำให้พบการระบาดของโรค และแมลงเปลี่ยนแปลงไป 1.1 โรคยอดไหม้ใบร่วงที่เคยระบาดรุนแรงในอำเภอสี ในช่วงที่ออกสำรวจปลายปี 2540 ไม่มีการระบาดเหมือนช่วงปลายปี 2539 เนื่องจากปี 2540 ฤดูหนาวมาถึงช้ามาก และไม่มีฝนตกชุก ในช่วงเดือนตุลาคม และ พฤศจิกายน 1.2 การระบาดของโรสีขาจะพบปริมาณสูงในช่วงลำไยออกดอก และแตกใบอ่อน อุณหภูมิความชื้น และปริมาณน้ำฝน ไม่มีอิทธิพลโดยตรงต่อจำนวนประชากรไรในสภาพสวน - พบหนอนกินเปลือกลำต้นเข้าทำลายบนต้นลำไย ที่แสดงอาการหงอย จากการสำรวจต้นลำไยที่แสดงอาการหงอยทั้งหมด 353 ต้น พบหนอนกินเปลือกทั้งหมด 3,090 ตัว - พบปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูพืชปริมาณสูงในสวนลำไย ที่แสดงอาการหงอยโดยเฉพาะชนิด <i>Rotylenchulus reniformis</i> 1.3 วงจรชีวิตของโรสีขา ตั้งแต่ระยะไข่จนกระทั่งเป็น ตัวเต็มวัยใช้ระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 6 วัน - พบศัตรูธรรมชาติของโรสีขา ซึ่งเป็นไรตัวห้ำ 2 ชนิด อยู่ในวงศ์ Phytoseidae แต่ปริมาณที่พบค่อนข้างน้อย - ได้พิสูจน์ว่าโรสีขาเป็นพาหะนำโรค ทำให้เกิดอาการพุ่มแฉ้ - จากการแยกเชื้อตัวอย่าง จากโรคยอดไหม้ใบร่วง พบสาเหตุเกิดจากเชื้อราในกลุ่ม Mycelia Sterilia มีชื่อว่า <i>Rhizoctonia</i> sp. เมื่อปลูกเชื้อนี้ลงบนต้นกล้าลำไยพบว่าสามารถทำให้เกิดอาการไหม้	75 %

2. หาวิธีการผลิตแอนติเซรุ่ม สำหรับตรวจหา MLO ในต้นอ่อนกิ่งตอน และต้นที่ปลูกในสวนทั่วไปพร้อมวิธีการตรวจสอบที่เหมาะสมสะดวก และรวดเร็ว	บริเวณที่ปลูกเชื้อ 2. วิธีการผลิตแอนติเซรุ่ม สำหรับตรวจหา MLO ในต้นลำไยกำลังดำเนินการหาเทคนิค ในการขยายปริมาณเชื้อโรค	
6 เดือนที่ 4 (1 มี.ค.41- 31 ส.ค. 41) 1. การประเมินความเสียหายทางเศรษฐกิจเบื้องต้น 2. ศึกษาการผลิตลำไยปลอดโรค โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 3. การศึกษาการบริหารศัตรูพืช โดยวิธีผสมผสาน 3.1 ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสวนลำไย 3.2 ศึกษาผลของสารเคมีที่มีพิษน้อยต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูลำไย 3.3 ศึกษาการใช้ชีววินทรีย์ เพื่อการควบคุมโรคและแมลงศัตรูลำไย	1. ทราบข้อมูลความเสียหายทางเศรษฐกิจเนื่องจากการระบาดของโรค และแมลง -ความเสียหายจากการเข้าทำลายของไรบนช่อใบและช่อดอกของลำไย ทำให้เสียหาย 1-50 % ในช่วงออกดอกไรเข้าทำลายช่อดอก ทำให้ไม่ติดผล -ผลลำไยร่วงสาเหตุดังกล่าวจากหนอนเจาะช้ำประมาณ 23 % ของผลร่วงทั้งหมด นอกจากนั้นเกิดจากสาเหตุอื่น ๆ จำนวนผลที่ร่วงคิดเป็นน้ำหนักประมาณ 4 กิโลกรัมต่อต้น หลังจากเก็บเกี่ยวแล้วพบความเสียหายของหนอนเจาะช้ำในผลผลิตประมาณ 4 % - ความเสียหายจากการมีวันหริกจากสารกำจัดวัชพืชทำให้ผลผลิตลำไยลดลงจากเดิมประมาณ 50 % - ต้นลำไยที่แสดงอาการหงอยพบว่าผลผลิตลดลงประมาณ 46 % ถ้ามีอาการรุนแรงต้นลำไยยืนต้นแห้งตาย 2. ได้สูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการชักนำให้เกิดยอด และรากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนตาข้างและเนื้อเยื่อส่วนของลำต้น 3. มีแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูสำคัญอย่างน้อย 3 โรคและแมลง 3 ชนิด 3.1 ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อรา ในการป้องกันโรคบนใบ เช่น ใบจุดโรคราดำได้ใบ พบว่า copper oxychloride ให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีที่สุด 3.2 การควบคุมการระบาดของโรคยอดไหม้ใบร่วง ในสภาพสวน พบว่าสารเคมี 4 ชนิดในกลุ่ม benalaxil + mancozeb (Leela -M), benomyl (Benlate), captan (Otho) และ carbendazim (Bavistin) สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้ดี 3.3 ผลจากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (bacterial antagonist) ต่อเชื้อสาเหตุโรคใบจุดดำบนใบลำไยใน	70 %

ควบคุมโรคและแมลงศัตรูลำไย 4. พิสูจน์สาเหตุของ प्रकारที่อาจทำให้ลำไยแสดงอาการหงอย 5. ปัญหาใหม่ที่พบ	antagonist) ต่อเชื้อสาเหตุโรคใบจุดดำบนใบลำไยในสภาพสวน พบ bacteria isolate คือ B4 สามารถยับยั้งราบนใบ 4. ได้พิสูจน์ว่า ไร้เดือนฝอย <i>Rotylenchulus reniformis</i> ที่พบในดินบริเวณทรงพุ่มของต้นลำไย เป็นศัตรูรากกินรากลำไย 5. พบอาการผิดปกติของลำไยชนิดใหม่ คือ ต้นลำไยมีอาการตายเฉียบพลัน โดยพบว่ามียืดหัวขึ้นคอตเนื่องบนดินรอบทรงพุ่มลำไย และพบเส้นใยของเห็ดหรือหุ้มราก เมื่อผ่าดูรากพบเปลือกแข็งจำนวนมากคลุมกินภายใต้เส้นใยของเห็ดหัวที่ห่อหุ้มราก สาเหตุที่ลำไยตายอาจเกิดจากเห็ดและเปลือกแข็งจะได้พิสูจน์ต่อไป	
6. เดือนที่ 5 (1 กย. 41-28 กพ. 42) 1. ดำเนินการบริหารศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน 1.1 เลือกวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชในสวนลำไย 1.2 ผักอบรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีแก่นักวิชาการ และผู้ประกอบการ 2. วิธีการผลิตแอนติเซรุ่มสำหรับตรวจหาเชื้อโรคไฟโตพลาสมา	1.1 ผลจากการเข้าทำลายของหนอนกินเปลือกลำไยทำให้ขนาดใบบนกิ่งที่หนอนเข้าทำลายมีขนาดลดลง 11 % เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดใบบนกิ่งหงอยที่ไม่มีหนอนเข้าทำลาย การป้องกันกำจัดหนอนกินเปลือกลำไยโดยใช้ไส้เดือนฝอย (<i>Steinernema carpocapsae</i>) จีดพื้นสามารถกำจัดหนอน ได้ 94 % - การทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีกำจัดเชื้อราลำไยพบว่าผงกำมะถัน (wettable Sulfur) มีประสิทธิภาพดีที่สุด - สารเคมี 3 ชนิดที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเข้าทำลายของหนอนหอนใบได้ 80 - 100 % คือ carbaryl, lambda cyhalothrin และ <i>Bacillus thuringiensis</i> พันธุ์ในระบะแตกใบอ่อน 1.2 - ผักอบรม ให้ความรู้ แก่นักวิชาการ และผู้ประกอบการ โดยเป็นวิทยากรบรรยายเรื่องโรคและแมลงที่สำคัญของลำไยและแนวทางในการป้องกันกำจัดอย่างต่อเนื่อง - จัดทำคู่มือโรคและแมลงศัตรูลำไย 2. ยังไม่สามารถผลิตได้*	60 % * ต้องพัฒนาเทคนิคในการแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์

3. ผลผลิตลำไยปลอดโรคเพื่อขยายพันธุ์ให้ชาวสวนไปปลูก	3. ยังไม่สามารถผลิตลำไยปลอดโรคได้ ** - ได้พัฒนาสูตรอาหาร M3 + sucrose 30 g/l + BA 1 mg/l (pH 5.8) เติม 0.01 % ascorbic acid ที่ได้ลดปริมาณการสร้างสาร phenolic compound ของเนื้อเยื่อลำไย และทำให้สร้างแคลลัสได้ 50 %	** พบเชื้อรา (endophytic fungi) แฝงอยู่ภายในเนื้อเยื่อ
6 เดือนที่ 6 (1 มี.ค. 42-31 ส.ค. 42) 1. สรุปผลงานวิจัยทั้งหมด 2. ตีพิมพ์งานวิจัยที่ได้ออกมา 3. เผยแพร่ผลงานวิจัยโดยวิธีต่าง ๆ	1. ได้รายงานการวิจัยเป็นรูปเล่ม 2. ผลงานวิจัยได้รับการตีพิมพ์ 3. ผลการวิจัยได้มีการปฏิบัติใช้โดยเกษตรกร	80 %

6. สรุป

งานวิจัยของโครงการที่ผ่านมาได้บรรลุตามวัตถุประสงค์ประมาณ 70 % ทำให้สามารถแก้ไขปัญหามาการหงอยในที่สุดและปัญหาการม้วนหงิกจากสารกำจัดวัชพืชได้ ตลอดจนแก้ไขปัญหาระบาดของโรคยอดไหม้-ใบร่วง และอาการใบปนเปื้อนจากเชื้อราโดยการใช้สารเคมีและป้องกันการระบาดหนอนกินเปลือกลำต้นโดยใช้ไส้เดือนฝอย (*Steinernema carpocapsae*) ซึ่งเกษตรกรได้นำไปใช้และได้ผลดี

อุปสรรคในการดำเนินงานที่ทำให้กิจกรรมบางประการ ไม่เป็นไปตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ เช่น การผลิตแอนติเซรุ่มสำหรับตรวจหาเชื้อโรคไฟโตพลาสมาและการผลิตต้นลำไยปลอดโรค ซึ่งไม่สามารถผลิตได้ทันในช่วงเวลาที่กำหนด 3 ปีนี้ เนื่องจากวิธีที่ได้ทดลองไปแล้วยังไม่ได้ผล จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการที่จะสกัด DNA จากพืชที่เป็นอาการพุ่มแจ้ และพัฒนาเทคนิคการแยกเชื้อไฟโตพลาสมาให้บริสุทธิ์เพื่อการผลิตแอนติเซรุ่มต่อไป

ส่วนการผลิตต้นลำไยปลอดโรคมีอุปสรรคที่สำคัญคือ พบเชื้อราแฝงอยู่ภายในเนื้อเยื่อ (endophytic fungi) ทำให้ยังไม่สามารถผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคได้ในขณะนี้

การแก้ไขปัญหามาการหงอยในสภาพพื้นที่ปกติ ไม่น้ำขัง และการแก้ไขปัญหามาการพุ่มแจ้ของต้นลำไยที่มีอายุมากยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังไม่สามารถระบุสาเหตุที่แท้จริงของอาการผิดปกติบนพืชดังกล่าวได้อย่างชัดเจน เนื่องจากอาจมีปัจจัยที่มากเกี่ยวข้องหลายอย่าง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการพิสูจน์ที่แท้จริงต่อไป นอกจากนี้ยังพบปัญหาใหม่ที่เกิดขึ้น คือ อาการคายเลียบพลันของลำไย ซึ่งจะต้องมีการพิสูจน์สาเหตุและแนวทางในการป้องกันกำจัดไม่ให้ระบาดลุกลาม ทำความเสียหายต่อต้นลำไยต่อไป

ได้เผยแพร่ผลงานวิจัยโดยวิธีต่าง ๆ เช่น เป็นวิทยากรให้ความรู้แก่เจ้าหน้าที่ส่งเสริมการเกษตรและเกษตรกร เสนอผลงานวิจัยในที่ประชุมสัมมนา และมีผลงานตีพิมพ์ในวารสารในประเทศ 7 เรื่อง และวารสารต่างประเทศ 1 เรื่อง

ได้จัดทำหนังสือคำแนะนำ เรื่อง โรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไย และแนวทางในการป้องกันกำจัดเบื้องต้น โดยมีภาพประกอบคำบรรยายประมาณ 372 ภาพ