



กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund)
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต
มันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน

Research and Development on Pests Management Technology for
Increase Efficiency Production of Cassava, Sugarcane
and Oil Palm

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นายอนุวัฒน์ จันทรสวรรณ
Mr. Anuwat Chantarasuwan

ปี 2565

บทสรุปผู้บริหาร

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย

ปัญหาสำคัญในการปลูกมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน คือ การเข้าทำลายของศัตรูพืช ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง ศัตรูมันสำปะหลังที่สำคัญ ได้แก่ โรคพุ่มแจ้ และไรแดง โรคพุ่มแจ้สาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้งในหัวลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ได้ ศัตรูอ้อยที่สำคัญ ได้แก่ โรคเหี่ยวเน่าแดง โรคใบขาวอ้อย ดัชนีหวาดยาวอ้อย และจักจั่นอ้อย โรคใบขาวอ้อยสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ จึงเกิดปัญหาการระบาดอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลผลิตในอ้อยปลูกลดลงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ บางพื้นที่เสียหายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถไว้ต่อได้ ต้องปลูกใหม่ โรคเหี่ยวเน่าแดงสามารถเข้าทำลายได้ทางรากและโคนต้น แพร่ระบาดได้ทางท่อนพันธุ์ ระบาดรุนแรงในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงเช่น ในเขตชลประทานหรือพื้นที่นา ทำให้ผลผลิตเสียหาย 30-100 เปอร์เซ็นต์ สูญเสียผลผลิตประมาณ 54 เปอร์เซ็นต์ พบดัชนีหวาดยาวอ้อยระบาดมีพื้นที่การระบาด 350 ไร่ ส่วนจักจั่นพบเข้าทำลายอ้อย ทำลายในอ้อยที่มีอายุประมาณ 2-3 เดือน ทำให้ใบอ้อยแห้ง คล้ายอาการขาดน้ำ ต้นอ้อยแคระแกร็น ไม่เจริญเติบโต ศัตรูปาล์มน้ำมันที่สำคัญ ได้แก่ โรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็ก โรคลำต้นเน่าทำให้ผลผลิตเสียหาย 30-70 เปอร์เซ็นต์ ปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ให้ผลผลิตเลย โรคลำต้นเน่าสามารถเข้าทำลายปาล์มน้ำมันได้ทุกระยะการเจริญเติบโต การจัดการศัตรูพืชที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ จะสามารถแก้ปัญหาความเสียหายเหล่านี้ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช โดยนำเทคโนโลยีที่มีอยู่มาศึกษาต่อยอด เพื่อให้ได้วิธีการควบคุมที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน ได้อย่างเหมาะสมและยั่งยืนต่อไป

2. วัตถุประสงค์

เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว โรคเหี่ยวเน่าแดง ดัชนีหวาดยาว และจักจั่นในอ้อย และวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน

3. ระเบียบวิธีวิจัย

เป็นการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดศัตรูมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน เพื่อจัดการศัตรูพืชที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสามารถแก้ปัญหาความเสียหายได้ โดยบูรณาการองค์ความรู้ในการจัดการโรค แมลง และวัชพืช รวดเร็วและทันสมัย ประกอบไปด้วยการสำรวจโรค แมลง และวัชพืช ตรวจวิเคราะห์ด้วยสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา ประเมินการเกิดความเสียหายจากศัตรูพืชและคัดเลือกวิธีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่ 1) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง 2) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูอ้อย 3) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน

4. งบประมาณที่ใช้ (ปี 2565) จำนวน 4,657,382 บาท ระยะเวลาที่ดำเนินงาน 1 ต.ค. 2564 – มี.ค. 2566

5. ผลการวิจัย

5.1 โครงการวิจัยย่อยวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชจากแปลงมันสำปะหลังพบเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 10 กลุ่ม การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีต่อกิ่งไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังอีกต้นหนึ่งได้ อาจเกิดจากปริมาณเชื้อไฟโต

พลาสมาไม่เพียงพอ การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา *Ca. P. 16Srl group* และ *16Srl group* แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอพืชปกติ เทคนิค LAMP ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคพุ่มแฉ้ในมันสำปะหลัง สามารถอ่านผลง่าย การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อการขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแฉ้ในมันสำปะหลังในสภาวะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อความเข้มข้นที่ระดับ 50 และ 100 ppm ของสารปฏิชีวนะทั้งสองชนิดสามารถขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ การศึกษาการเจริญเติบโตของไรแดงในสภาพห้องปฏิบัติการ ไรแดงเพศผู้และเพศเมียมีระยะเวลาจากไข่ถึงตัวเต็มวัยเท่ากับ 6.77 และ 7.21 วัน ตามลำดับ การทดสอบความต้านทานต่อไรแดงมันสำปะหลังมี 4 พันธุ์ที่มีลักษณะความเสียหายน้อยกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 3 ระยอง 13 และระยอง 60

5.2 โครงการวิจัยย่อยวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูอ้อย เทคนิค Multiplex-PCR สามารถจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 3 ชนิด ได้แก่ white leaf, grassy shoot และ green grassy shoot มีความไวตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา เทคนิค LAMP ไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว สามารถอ่านผลง่ายและรวดเร็ว ยีน *imp* จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 1 คู่ ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในสภาพเนื้อเยื่ออ้อยได้แคลลัสจากอ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l และต้นที่มีปริมาณเชื้อน้อยกว่า 5 copy/ μ l เชื้อ *Streptomyces* จำนวน 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอ้อยได้ แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้เชื้อจำนวน 30 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดงในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้จำนวน 103 ไอโซเลท เชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 32 ไอโซเลท การประเมินความรุนแรงของเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือน พบพันธุ์ UT3 เกิดโรครุนแรงที่สุด การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูอ้อย สารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย คือ เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ DOA-M14 อัตรา 10 กก./ไร่ และไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* อัตรา 75 กรัม/น้ำ 20 ลิตร การศึกษาประชากรของจักจั่นอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยของเกษตรกร 5 จังหวัด พบจักจั่นอ้อยใน 3 จังหวัด ได้แก่ สิงห์บุรี อ่างทอง และกาญจนบุรี ส่วนสุพรรณบุรีและชัยนาทไม่พบจักจั่นอ้อย การศึกษาชีววิทยาของจักจั่นอ้อย ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม ระยะตัวอ่อนอาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบและใต้รากอ้อย ลักษณะของตัวอ่อน ส่วนหัว หนวด ออก ท้อง และขา เมื่อฟักใหม่มีสีแดงใสหลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ตัวเต็มวัย ส่วนหัว ขาสีน้ำตาล ตาสีแดง ออกสีน้ำตาลสลับแถบเหลือง และปีกสีน้ำตาลเหลือง อาศัยอยู่บริเวณใบและยอดอ้อย

5.3 โครงการวิจัยย่อยวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างได้ เชื้อรา *Ganoderma* spp. จำนวน 41 ไอโซเลท ลักษณะดอกเห็ดของเชื้อรา *Ganoderma* spp. แบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ คือ รูปร่างใบพัดมีก้านดอก รูปร่างใบพัดไม่มีก้านดอก รูปร่างก้อนกลมมีก้านดอก และรูปร่างก้อนกลมไม่มีก้านดอก สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม พบทั้งมีและไม่มีขอบสีขาว เมื่อแยกเชื้อรา *Ganoderma* spp. บนอาหาร PDA พบลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น การประเมินลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าด้วยยีน *EgIFR* และ *EgMT-1* สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันได้ การวิเคราะห์ Gene ontology พบกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนทาน มีการแสดงออกมากที่สุด 5 กลุ่มแรก ได้แก่ Ribosome, Ribosome biogenesis in eukaryotes, Plant hormone signal transduction, RNA transport และ Protein processing in endoplasmic reticulum การใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ได้ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ

จำนวนสปอร์ของ *Streptomyces* sp. พบว่า ข้าวโพดเกล็ดเป็นวัสดุที่เหมาะสมที่สุด การป้องกันกำจัดหนอนหน้า
แมงและหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน ทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีด้วยการฉีดเข้าลำต้นอยู่ระหว่างเก็บข้อมูล

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากงานวิจัย

6.1 ข้อเสนอแนะจากผลงานวิจัย จากข้อมูลการทดลองในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีต่อกิ่ง พบว่า ไม่
สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Nested PCR ได้ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อต่ำหรือไม่สามารถถ่ายทอดด้วยวิธี
ดังกล่าวได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเพิ่มวิธีการถ่ายทอดโรคโดยการใช้ต้นฝอยทองมาทำการถ่ายทอดเชื้อเพิ่มเติมให้ผลการทดลอง
เป็นไปตามสมมติฐาน และมีแนวทางการใช้เทคนิค Real time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาต่อไป

6.2 ข้อเสนอแนะจากผู้วิจัย จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาเบื้องต้นยังมีบางการทดลองอยู่ระหว่างเก็บข้อมูล
ซึ่งยังไม่สามารถสรุปผลได้ จึงจำเป็นต้องดำเนินการต่อให้แล้วเสร็จ และมีบางการทดลองจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนวิธี
การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานและถูกต้องที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์หรือต่อยอด
งานวิจัยต่อไปได้

7. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

7.1 ประโยชน์ที่เกิดต่อผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรง อบรมถ่ายทอดวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบ
ขาวในอ้อยโดยใช้เทคนิค LAMP ให้กับเจ้าหน้าที่ของบริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซูการ์ คอร์ปอเรชั่น
จำกัด (มหาชน) สาขา 3 เพื่อตรวจคัดกรองโรคใบขาวอ้อยในแปลงพันธุ์ก่อนนำไปขยายพันธุ์ให้กับเกษตรกร

7.2 ประโยชน์ทางวิชาการ นำเสนอผลงานวิจัย ภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 24 ปี
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และผลงานได้ดีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 51 ฉบับเพิ่มเติม 1
2566 เรื่อง การพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฝอยและ
โรคกอตะไคร้ในครั้งเดียว ซึ่งเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอนในวงนักวิชาการและผู้สนใจด้าน
วิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอด การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ

7.3 หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ และเกิดประโยชน์ในด้านใด (เศรษฐกิจ สังคม สิ่งแวดล้อม)
ด้านเศรษฐกิจ หน่วยงานภาครัฐและเอกชนนำผลงานวิจัยที่ได้ไปใช้ประโยชน์คัดกรองโรคใบขาวอ้อยในแปลงพันธุ์
ก่อนนำไปขยายพันธุ์ให้กับเกษตรกรซึ่งส่งผลให้เกษตรกรได้ท่อนพันธุ์อ้อยที่สะอาดปลอดโรคไปปลูก ลดความ
เสียหายจากท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคได้และอ้อยมีผลผลิตดีขึ้น เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น

8. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

8.1 เผยแพร่ผลงานวิจัย ภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 24 คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น เรื่อง การพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรค
ใบขาวแตกกอฝอยและโรคกอตะไคร้ในครั้งเดียว และผลงานได้ดีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 51 ฉบับ
เพิ่มเติม 1 ปี 2566

8.2 อบรมถ่ายทอดวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยโดยใช้เทคนิค LAMP ให้กับเจ้าหน้าที่ของ
บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา 3 จำนวน ราย เมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม
2565 จำนวน 25 ราย ณ แปลง บริษัท ดงบ้านโพธิ์ จำกัด หมู่ 7 ตำบลหัวดง อำเภอเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน มีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแฉับและไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง การป้องกันกำจัดโรคใบขาว โรคเหี่ยวเน่าแดง ตัวงหนวดยาว และจักจั่นในอ้อย และการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน ผลการดำเนินงานในปี 2565 คือ การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชจากแปลงมันสำปะหลังพบเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 10 กลุ่ม การถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีต่อกิ่งไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังอีกต้นหนึ่งได้อาจเกิดจากปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาไม่เพียงพอ การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ไพรมเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา *Ca. P. 16SrI* group และ *16SrII* group แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอพืชปกติ เทคนิค LAMP ไพรมเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคพุ่มแฉับในมันสำปะหลัง การใช้สารปฏิชีวนะเพื่อการขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแฉับในมันสำปะหลังในสภาวะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อความเข้มข้นที่ระดับ 50 และ 100 ppm ของสารปฏิชีวนะทั้งสองชนิดสามารถขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ การศึกษาการเจริญเติบโตของไรแดงในสภาพห้องปฏิบัติการ ไรแดงเพศผู้และเพศเมียมีระยะเวลาจากไข่ถึงตัวเต็มวัยเท่ากับ 6.77 และ 7.21 วัน ตามลำดับ การทดสอบความต้านทานต่อไรแดงมันสำปะหลังมี 4 พันธุ์ที่มีลักษณะความเสียหายน้อยกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 3 ระยอง 13 และระยอง 60 การพัฒนาเทคนิค multiplex-PCR สามารถจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 3 ชนิด ได้แก่ white leaf, grassy shoot และ green grassy shoot เทคนิค LAMP ไพรมเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว ยีน *imp* จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยสามารถออกแบบไพรมเมอร์ได้จำนวน 1 คู่ ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในสภาพเนื้อเยื่ออ้อยได้แคลลัสจากอ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l และต้นที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l เชื้อ *Streptomyces* จำนวน 3 ไอโซเลต สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอ้อยได้ แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้เชื้อจำนวน 30 ไอโซเลต ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดงในห้องปฏิบัติการ สามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้จำนวน 103 ไอโซเลต เชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 32 ไอโซเลต การประเมินความรุนแรงของเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือน พบพันธุ์ UT3 เกิดโรครุนแรงที่สุด การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูอ้อยสารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวงหนวดยาวอ้อย คือ เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ DOA-M14 อัตรา 10 กก./ไร่ และไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* อัตรา 75 กรัม/น้ำ 20 ลิตร การศึกษาประชากรของจักจั่นอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยของเกษตรกร 5 จังหวัด พบจักจั่นอ้อยใน 3 จังหวัด ได้แก่ สิงห์บุรี อ่างทอง และกาญจนบุรี ส่วนสุพรรณบุรีและชัยนาทไม่พบจักจั่นอ้อย การศึกษาชีววิทยาของจักจั่นอ้อย ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม ระยะตัวอ่อนอาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบและใต้รากอ้อย ลักษณะของตัวอ่อน ส่วนหัว หนวด ออก ท้อง และขา เมื่อฟักใหม่มีสีแดงใสหลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ตัวเต็มวัย ส่วนหัว ขา สีน้ำตาล ตาสีแดง ออกสีน้ำตาลสลับแถบเหลือง และปีกสีน้ำตาลเหลือง อาศัยอยู่บริเวณใบและยอดอ้อย การสำรวจและเก็บตัวอย่างได้ เชื้อรา *Ganoderma* spp. จำนวน 41 ไอโซเลต ลักษณะดอกเห็ดของเชื้อรา *Ganoderma* spp. แบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ คือ รูปร่างใบพัดมีก้านดอก รูปร่างใบพัดไม่มีก้านดอก รูปร่างก้อนกลมมีก้านดอก และรูปร่างก้อนกลมไม่มีก้านดอก สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม พบทั้งมีและไม่มีขอบสีขาว การประเมินลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าด้วยยีน *EgIFR* และ *EgMT-1* สามารถ

จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์หนานและไมหนานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันได้ การวิเคราะห์ Gene ontology พบกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการหนาน มีการแสดงออกมากที่สุด 5 กลุ่ม ได้แก่ Ribosome, Ribosome biogenesis in eukaryotes, Plant hormone signal transduction, RNA transport และ Protein processing in endoplasmic reticulum การใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน ได้ศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณจำนวนสปอร์ของ *Streptomyces* sp. พบว่า ข้าวโพดเกล็ดเป็นวัสดุที่เหมาะสมที่สุด

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

A pest management technology research and development project to enhance the production efficiency of cassava, sugarcane, and oil palm was aimed at researching and developing technology for the protection of cassava witches' broom disease and red mite, sugarcane disease and insect pests, and oil palm disease and insect pests. The results in 2022 found that survey and collection of plant samples from cassava fields found 10 groups of phytoplasma. The transmission of cassava witches' broom phytoplasma by the grafting technique was unsuccessful due to insufficient amount of phytoplasma. The development of multiplex PCR was successful with the developed primers and showed a high specificity with phytoplasma groups of *Ca. P. 16Srl* group and *16SrlI* group as well as none specific with normal plant DNA. LAMP was successful with the developed primers and showed a high specificity for cassava witches' broom phytoplasma at 65 °C. The use of antibiotics for eliminated phytoplasma of cassava bushes in tissue culture at concentrations of 50 and 100 ppm of both types of antibiotics were able to eliminate phytoplasma in cassava plants in tissue culture. Study on the growth of red mite in laboratory found that red mite males and females have a period from eggs to adults at 6.77 and 7.21 days, respectively. The study on red mite resistance demonstrated that four cassava varieties (Rayong 1, Rayong 3, Rayong 13, and Rayong 60) were low derogation. The multiplex-PCR technique was developed and can identified of three phytoplasma including white leaf, grassy shoot, and green grassy shoot. The developed LAMP technique for sugarcane phytoplasma detection was designed one set of primer from *imp* gene with specific to phytoplasma at 65 °C. The production of sugarcane tissue culture was sugarcane white leaf infected callus with an infection of 100 copies/ μ l and 5 copies/ μ l of stalk. Three isolates were able to control sugarcane fungus pathogens, and 30 isolates of *Bacillus* spp. were produced IAA. The morphological characteristics of the causative agent of red rot wilt were studied. The 103 of *Colletotrichum* spp. and 32 of *Fusarium* spp. were isolated. The results found that UT3 was the most severe disease. The effective biochemicals for the control of the sugarcane long-horned beetle were *Metarhizium anisopliae* strain DOA-M14 at the rate of 10 kg/rai and *Steinernema carpocapsae* at the rate of 75 g/20 liters of water. Population study of sugarcane cicadas in sugarcane plantation areas in 5 provinces were survey. Sugarcane cicadas were found in 3 provinces: Sing Buri, Ang Thong, and Kanchanaburi but were not found in Suphan Buri and Chai Nat. Studying the biology of *Platypleura cespiticola* Boulard found that adult females lay eggs in clusters. The larvae lived in the soil by digging long holes in the soil when they were hatching. Characteristics of the larva: head, antennae, thorax, abdomen and legs when newly hatched, clear red, after that, turns milky white. Adults lived in the leaves and shoots of sugarcane. The head, legs were brown, eyes were red, and the chest was brown with yellow stripes and yellow-brown

wings. In the research and development of protection technology for oil palm disease and insect pests, the fruiting bodies of *Ganoderma* spp. were collected, with a total of 41 isolates. Basidiocarp morphologies for *Ganoderma* spp. could be classified into 4 groups, including fan shape with stipitate, fan shape with astipitate, nodule shape with stipitate, and nodule shape with astipitate. The results from DNA sequencing revealed that primers obtained from EgIFR_F/EgIFR_R and EgMT-1_F/EgMT-1_R can categorize the difference between nucleotide sequences of basal stem rot tolerance and none tolerance in oil palm varieties. Gene ontology analysis revealed the first five most expressed gene groups: ribosome, ribosome biogenesis in eukaryotes, plant hormone signal transduction, RNA transport, and protein processing in the endoplasmic reticulum. The optimum materials for increasing the number of spores of *Streptomyces* sp. was corn flakes.

คณะวนศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับงบประมาณสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) โดยคณะผู้วิจัย ขอขอบคุณผู้อำนวยการ นักวิชาการ และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และกองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร เจ้าหน้าที่ของบริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา 3 ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และสิ่งอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย นอกจากนี้ยังขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกมันสำปะหลังจังหวัดกำแพงเพชร ตาก นครสวรรค์ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ลพบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ระยอง นครราชสีมา สระแก้ว และชลบุรี เกษตรกรผู้ปลูกอ้อยจังหวัดอุดรดิษฐ์ อุดรธานี มุกดาหาร อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท ราชบุรี สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี และเกษตรกรผู้ปลูกปาล์มน้ำมันภาคใต้ และภาคกลาง อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี สำหรับตัวอย่างในการทำวิจัย ทำให้งานทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	2
บทคัดย่อ	5
Abstract	7
กิตติกรรมประกาศ	9
สารบัญ	10
สารบัญภาพ	11
สารบัญตาราง	15
บทที่ 1 บทนำ	16
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	21
บทที่ 3 ผลการศึกษา	23
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	72
เอกสารอ้างอิง	77
ภาคผนวก	85

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กรอบการวิจัยของแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน	22
ภาพที่ 2	พืชที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา	23
ภาพที่ 3	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ้ที่พบจากการสำรวจ ปี 2565	24
ภาพที่ 4	แสดงตอกิ่ง 2 กรรมวิธี (A) ต้นตอคือต้นแสดงอาการพุ่มแฉ้ตอกิ่งด้วยต้นปกติ (B) ต้นตอปกติต่อด้วยต้นแสดงอาการพุ่มแฉ้	24
ภาพที่ 5	การเปรียบเทียบความไววิธีการ Nested-PCR (A) กับ Multiplex-PCR (B) ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ้	25
ภาพที่ 6	การเปรียบเทียบความไวความจำเพาะของ Multiplex-PCR ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ้	25
ภาพที่ 7	การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการตรวจวิเคราะห์โรคพุ่มแฉ้มันสำปะหลัง A=ผลของปฏิกิริยา LAMP ภายใต้แสงยูวี B=ผลของปฏิกิริยา LAMP วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ Myabscope ตัวอย่างโรคพุ่มแฉ้มันสำปะหลัง No.1-4 ตัวอย่างโรคใบขาวอ้อย No.5-6 Positive control No.7 และ Healthy control No.8	26
ภาพที่ 8	จำนวนไรแดงมันสำปะหลังในสัปดาห์ที่ 1 – 4 หลังปล่อยบนต้นมันสำปะหลัง 16 พันธุ์	26
ภาพที่ 9	ระดับความเสียหายในสัปดาห์ที่ 1 – 4 หลังปล่อยไรแดงมันสำปะหลังบนต้นมันสำปะหลัง 16 พันธุ์	27
ภาพที่ 10	ขนาดชิ้นยีนของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยด้วยเทคนิค multiplex PCR	27
ภาพที่ 11	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ 16S rRNA gene sequences ของเชื้อ Phytoplasma สาเหตุโรคอ้อย The bar represents the phylogenetic distance of 5 %. Numbers on branches are confidence percentage obtained from 1,000 bootstrap replicates.	29
ภาพที่ 12	ผลการตรวจโรคไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยด้วยวิธี Nested-PCR. 1-10= sugarcane sample, 11= positive control, 12 = negative control.	30
ภาพที่ 13	ผลการตรวจโรคไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยด้วยวิธี Multiplex PCR. 1-3 = white leaf: SCWL, 4-6 = grassy shoot: SCGS, 7-10 = green grassy shoot: SCGG5 11= positive control, 12 = negative control.	30
ภาพที่ 14	ตำแหน่งไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP	32
ภาพที่ 15	ผลของปฏิกิริยาแลมป์ภายใต้แสงยูวี	32
ภาพที่ 16	ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Primer IMP หมายเลข (1-5) ใบอ้อยจากห้องเพาะเลี้ยง (6-9) ใบมันสำปะหลังที่เป็นโรค (10-12) SCWL, SCGS และ SCGG5	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 17	ผลการเปรียบเทียบลำดับโปรตีนของยีน IMP พบว่า มีส่วนที่เหมือนกับ hypothetical protein 36
ภาพที่ 18	ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Primer IMP หมายเลข (1-4) SCWL (5-8) SCGGS (9-11) SCGS SCW, SCGS, SCGGS 36
ภาพที่ 19	ผลการวิเคราะห์ Phylogeny และ ค่า Diversity ของนิวคลีโอไทด์เชื้อโฟโตพลาสมา สาเหตุโรคอ้อย 37
ภาพที่ 20	A นำต้นที่ผ่านการตรวจวัดระดับเชื้อมาชักนำให้เกิดแคลัส (1) ตัดเป็นท่อน (2) นำไปล้างด้วยน้ำยาล้างจาน 38 B (1) นำไปล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที (2) ฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox (6% w/w) ที่ความเข้มข้น 30% ที่เติม Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที C นำไปล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นซับน้ำด้วยการดาช ปลอดภัย D ปลอกเปลือกหุ้มออกประมาณ 3-4 ชั้น แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ วางบนอาหาร Murashige and Skoog's สูตร MSC E แสดงแคลัสที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSC F แสดงการขยายแคลัส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSC2 G แสดงการชักนำให้เกิดต้นของ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSS1 อายุประมาณ 1 เดือน H แสดงการชักนำให้เกิดต้นของ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSS1 อายุประมาณ 2 เดือน
ภาพที่ 21	เชื้อ <i>Streptomyces</i> A=เชื้อบนอาหาร AGMA B=เชื้อบนอาหาร AGMB 40
ภาพที่ 22	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอ้อยในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ 40
ภาพที่ 23	แสดงการชักนำให้เกิดต้นของ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSS1 อายุประมาณ 1 เดือน 40
ภาพที่ 24	ลักษณะเซลล์ของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (rod shapes) ติดสีแกรม บวก 41
ภาพที่ 25	ลักษณะการสร้างเอ็นโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. 41
ภาพที่ 26	PCR product ของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. ที่คัดเลือก 44
ภาพที่ 27	ลักษณะรอยตัวเต็มวัยของจักจั่นอ้อยวางไข่ในเส้นกลางใบอ้อย 50

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 28	ระยะไข่ของจักจั่นอ้อย	50
ภาพที่ 29	ลักษณะรูที่ตัวอ่อนจักจั่นอ้อยอาศัยและคราบของตัวอ่อน	50
ภาพที่ 30	ระยะตัวอ่อนของจักจั่นอ้อย	50
ภาพที่ 31	ตัวเต็มวัยของจักจั่นอ้อย	51
ภาพที่ 32	การเก็บรวบรวมจักจั่นอ้อยในแปลงอ้อย	51
ภาพที่ 33	ปลุกอ้อยและเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจักจั่นอ้อย	51
ภาพที่ 34	ลำต้นโคนล้มเนื่องจากเส้นใยของเชื้อรา <i>Ganoderma</i> spp. เข้าทำลายอยู่ภายใน	51
ภาพที่ 35	เศษซากปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งสะสมเชื้อ	53
ภาพที่ 36	ลักษณะความหลากหลายของดอกเห็ดเชื้อรา <i>Ganoderma</i> spp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน	53
ภาพที่ 37	ลักษณะดอกเห็ดกลุ่มที่ 1 รูปร่างใบพัดมีก้านดอก	53
ภาพที่ 38	ลักษณะดอกเห็ดกลุ่มที่ 2 รูปร่างใบพัดไม่มีก้านดอก	54
ภาพที่ 39	ลักษณะดอกเห็ดกลุ่มที่ 3 รูปร่างก้อนกลมมีก้านดอก	54
ภาพที่ 40	รูปร่างก้อนกลมไม่มีก้านดอก	54
ภาพที่ 41	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา <i>Ganoderma</i> spp.	54
ภาพที่ 42	Clamp connection บนเส้นใยเชื้อรา <i>Ganoderma</i> spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	55
ภาพที่ 43	การตรวจคุณภาพอาร์เอ็นเอของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยแถวที่ 1 สายพันธุ์หนานทานต่อโรคลำต้นเน่า (T11R3); แถวที่ 2 สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า (T7R3); แถวที่ 3 สายพันธุ์ควบคุม; M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker	62
ภาพที่ 44	กราฟวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของ Unigene ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง แยกตามขนาด	62
ภาพที่ 45	แผนภาพแสดงการระบุหน้าที่ของ Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ด้วยฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน ได้แก่ Nr database ของ NCBI, COG database, Swissprot database และ KEGG database	63
ภาพที่ 46	แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน จาก 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์หนานทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง	63
ภาพที่ 47	แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน จาก 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์หนานทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง โดย KEGG pathway	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า	
ภาพที่ 48	แสดงจำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ถูกจัดเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า (สีน้ำเงินคือ Down regulation สีแดงคือ Up regulation)	64
ภาพที่ 49	แผนภาพเวนนแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง จาก 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า	65
ภาพที่ 50	แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันใน 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง	65
ภาพที่ 51	แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในชุดข้อมูล 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง โดย KEGG pathway	65
ภาพที่ 52	สำรวจการระบาดของหนอนหน้าแมวในแปลงเกษตรกร อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี	67
ภาพที่ 53	ฉีดยาเข้าลำต้นแปลงปาล์มน้ำมันที่มีการระบาดของหนอนปลอกเล็ก	67

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบอ้อยด้วยเทคนิค Multiplex PCR	29
ตารางที่ 2	ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย	33
ตารางที่ 3	ประสิทธิภาพของเชื้อ <i>Streptomyces</i> spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอ้อยในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ	39
ตารางที่ 4	ปริมาณสาร IAA ที่ผลิตโดยเชื้อ <i>Bacillus</i> sp. รอบรากอ้อย	42
ตารางที่ 5	ปฏิกิริยาต่อเชื้อ <i>Colletotrichum falcatum</i> ในอ้อย 5 พันธุ์	45
ตารางที่ 6	ปฏิกิริยาต่อเชื้อ <i>Fusarium moniliforme</i> ในอ้อย 5 พันธุ์	45
ตารางที่ 7	การประเมินความรุนแรงของเชื้อรา <i>C. falcatum</i> ต่ออ้อยพันธุ์การค้า จำนวน 13 พันธุ์	46
ตารางที่ 8	การประเมินความรุนแรงของเชื้อรา <i>F. moniliforme</i> ต่ออ้อยพันธุ์การค้า จำนวน 13 พันธุ์	46
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อย ในไร่เกษตรกร อ.เมือง จ.นครสวรรค์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึงเดือนกันยายน 2565	47
ตารางที่ 10	เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อย ในไร่เกษตรกร อ.เมือง จ.นครสวรรค์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึง เดือนกันยายน 2565	48
ตารางที่ 11	เวลาในการเจริญของเชื้อ <i>Ganoderma</i> sp. จนเต็มขึ้นไม้ยางพารา สารละลายเส้นใย และขี้เลื่อยไม้ยางพารา	55
ตารางที่ 12	แสดงจำนวน reads บนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing ก่อนการคัดเลือก (filtering)	60
ตารางที่ 13	แสดงจำนวน reads บนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing หลังการคัดเลือก (filtering)	60
ตารางที่ 14	แสดงจำนวน Contig และ Unigene จากการวิเคราะห์ De novo assembly	61
ตารางที่ 15	แสดงการกระจายตัวของ Unigene จากข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง แยกตามขนาด	61
ตารางที่ 16	แสดงการ annotation (การระบุหน้าที่ของยีน) ของ Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ด้วยฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน	61
ตารางที่ 17	แสดงตัวอย่างยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสองตัวอย่าง (Differently expressed genes; DEGs) ทั้งยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้น (Up regulation) และยีนที่แสดงออกลดลง (Down regulation) ในชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า 50 อันดับแรก	61
ตารางที่ 18	ความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ <i>Streptomyces</i> sp. บนวัสดุต่าง ๆ	66

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

พันธกิจ

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตภัณฑ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติการด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง

เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ

ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน

เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก

ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์

คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษ และภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม

ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม

สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ

ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน

ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ

การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 จำนวน 4,657,382 บาท

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

มันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญและมีศักยภาพสูงของประเทศไทย เป็นแหล่งอาหารและแหล่งพลังงานที่สำคัญของทั้งมนุษย์และสัตว์ ในฤดูกาลผลิต ปี 2561/62 ประเทศไทยผลิตมัน

สำปะหลังมากเป็นอันดับ 3 ของโลก มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 8.7 ล้านไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 31.1 ล้านตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 10 ของผลผลิตทั่วโลก มีมูลค่า 67,444 ล้านบาท ในฤดูกาลผลิต ปี 2560/61 ประเทศไทยผลิตอ้อยมากเป็นอันดับ 3 ของโลก มีพื้นที่เก็บเกี่ยวประมาณ 11.2 ล้านไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 131.7 ล้านตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 7 ของผลผลิตทั่วโลก มีมูลค่า 100,500 ล้านบาท ในฤดูกาลผลิต ปี 2561/62 ประเทศไทยผลิตปาล์มน้ำมันมากเป็นอันดับ 3 ของโลก มีพื้นที่ให้ผลผลิตประมาณ 5.3 ล้านไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 15.5 ล้านตันต่อปี คิดเป็นร้อยละ 4 ของผลผลิตทั่วโลก มีมูลค่า 48,155 ล้านบาท

ปัญหาสำคัญในการปลูกมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน คือ การเข้าทำลายของศัตรูพืช ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง ศัตรูมันสำปะหลังที่สำคัญ ได้แก่ โรคพุ่มแจ้ และไรแดง โรคพุ่มแจ้สาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแป้งในหัวลดลง 30 เปอร์เซ็นต์ เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ได้ ส่วนไรแดงมันสำปะหลังเป็นศัตรูพืชมีขนาดเล็กมาก เกษตรกรอาจไม่สังเกตเห็น หรือ พบการเข้าทำลายอีกทีเมื่อเกิดความเสียหายขึ้นแล้ว พบโรคพุ่มแจ้ระบาดในหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัดระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว จันทบุรี ปราจีนบุรี กำแพงเพชร และกาญจนบุรี เฉพาะที่จังหวัดระยอง จันทบุรี และสระแก้ว มีพื้นที่การระบาด 529 ไร่ ส่วนไรแดง พบระบาดในจังหวัดนครราชสีมา กาญจนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และสระแก้ว พบพื้นที่การระบาด 11,366 ไร่ ศัตรูอ้อยที่สำคัญ ได้แก่ โรคเหี่ยวเน่าแดง โรคใบขาวอ้อย ดั๋งหนวด ยาวอ้อย และจักจั่นอ้อย โรคใบขาวอ้อยสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ จึงเกิดปัญหาการระบาดอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลผลิตในอ้อยปลูกลดลงถึง 30-40 เปอร์เซ็นต์ บางพื้นที่เสียหายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถไว้ต่อได้ ต้องปลูกใหม่ พบโรคใบขาวอ้อยระบาดในจังหวัดอุดรธานี ขอนแก่น นครราชสีมา ชัยภูมิ สระแก้ว ปราจีนบุรี กำแพงเพชร และกาญจนบุรี โรคเหี่ยวเน่าแดงสามารถเข้าทำลายได้ทางรากและโคนต้น แพร่ระบาดได้ทางท่อนพันธุ์ ระบาดรุนแรงในพื้นที่ที่มีความชื้นสูงเช่น ในเขตชลประทานหรือพื้นที่นา ทำให้ผลผลิตเสียหาย 30-100 เปอร์เซ็นต์ พบโรคเหี่ยวเน่าแดงระบาดในจังหวัดกำแพงเพชร อุดรดิตถ์ กาญจนบุรี นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี สุพรรณบุรี ขอนแก่น อุดรธานี ชลบุรี และระยอง การเข้าทำลายของดั๋งหนวดยาวอ้อยทำให้ผลผลิตอ้อยปลูกลดลง 13-43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอ้อยต่อ 1 สูญเสียผลผลิตประมาณ 54 เปอร์เซ็นต์ พบดั๋งหนวดยาวอ้อยระบาดในจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ และกำแพงเพชร เฉพาะที่จังหวัดราชบุรี มีพื้นที่การระบาด 350 ไร่ ส่วนจักจั่นพบเข้าทำลายอ้อยครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2559 ในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดสุพรรณบุรี โดยพบที่อำเภอสามชุก ประมาณ 300 ไร่ และอำเภอศรีประจันต์ ประมาณ 50 ไร่ พบเข้าทำลายในอ้อยที่มีอายุประมาณ 2-3 เดือน ทำให้ใบอ้อยแห้ง คล้ายอาการขาดน้ำ ต้นอ้อยแคระแกร็น ไม่เจริญเติบโต ถ้าพบเข้าทำลายมากทำให้อ้อยตายทั้งกอ ต่อมาในปี พ.ศ. 2562 พบพื้นที่การระบาดในจังหวัดสุพรรณบุรีเพิ่มขึ้นเป็น 4,423 ไร่ ศัตรูปาล์มน้ำมันที่สำคัญ ได้แก่ โรคลำต้นเน่า หนอนหน้า แมว และหนอนปลอกเล็ก โรคลำต้นเน่าทำให้ผลผลิตเสียหาย 30-70% ปาล์มน้ำมันที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตลดลงหรือไม่ให้ผลผลิตเลย โรคลำต้นเน่าสามารถเข้าทำลายปาล์มน้ำมันได้ทุกระยะการเจริญเติบโต พบโรคลำต้นเน่าระบาดในจังหวัดกระบี่ สุราษฎร์ธานี และชุมพร มีพื้นที่ระบาด 215 ไร่ หนอนหน้าแอมวและหนอนปลอกเล็ก เป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของปาล์มน้ำมัน เข้าทำลายใบที่รวดเร็ว สร้างความเสียหายให้กับปาล์มน้ำมัน พบหนอนหน้าแอมวระบาดในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี กระบี่ ปทุมธานี ฉะเชิงเทรา นครนายก สระแก้ว และสุพรรณบุรี เฉพาะในจังหวัดปทุมธานี และฉะเชิงเทรา พบพื้นที่ระบาด 190 ไร่ ส่วนหนอนปลอกเล็ก พบระบาดในจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี และกระบี่ เฉพาะในจังหวัดกระบี่ และสุราษฎร์ธานี มีพื้นที่ระบาด 562 ไร่

การระบาดของศัตรูพืชในมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน ทำให้ผลผลิตเสียหายและลดลง มีผลต่อรายได้เกษตรกรโดยตรงและส่งผลกระทบต่อยิ่งภาคอุตสาหกรรมที่ใช้พืชเหล่านี้เป็นวัตถุดิบ ถ้ามีเทคโนโลยีในการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เกษตรกรสามารถเลือกใช้ได้อย่างเหมาะสม จะลดความเสียหายของผลผลิตที่เกิดจากการเข้าทำลายของศัตรูพืชลงได้ ทำให้การผลิตพืชมีประสิทธิภาพ ช่วยให้การปลูกมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมันได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งในปี 2563 พบการระบาดของโรคพุ่มแจ้และไรแดงในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังประมาณ 11,895 ไร่ ถ้าสามารถแก้ปัญหาการระบาดได้อย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ระบาด เท่ากับ 1,189.50 ไร่ คิดเป็นมูลค่า 9,256,236.99 บาท (ที่ผลผลิตเฉลี่ย 3,586 กิโลกรัม/ไร่ และราคา 2.17 บาท/กิโลกรัม) การระบาดของโรคใบขาวอ้อย โรคเหี่ยวเน่าแดงอ้อย ด่างหนวดยาวอ้อย และจักจั่นอ้อย ในพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 4,795 ไร่ ถ้าสามารถแก้ปัญหาการระบาดได้อย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ระบาด เท่ากับ 479.50 ไร่ คิดเป็นมูลค่าประมาณ 3,611,664 บาท โดยคิดที่ผลผลิตเฉลี่ย 10,749 กิโลกรัม/ไร่ และราคา 0.70 บาท/กิโลกรัม และการระบาดของโรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็ก ในพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันประมาณ 967 ไร่ ถ้าหากสามารถแก้ปัญหาการระบาดได้อย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ระบาดเท่ากับ 96.70 ไร่ คิดเป็นมูลค่า 752,751.48 บาท (ที่ผลผลิตเฉลี่ย 2,994 กิโลกรัม/ไร่ และราคา 2.60 บาท/โลกรัม) (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2563; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) การจัดการศัตรูพืชที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ จะสามารถแก้ปัญหาความเสียหายเหล่านี้ได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช โดยนำเทคโนโลยีที่มีอยู่มาศึกษาต่อยอด เพื่อให้ได้วิธีการควบคุมที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเกษตรกรสามารถนำไปใช้ในการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน ได้อย่างเหมาะสมและยั่งยืนต่อไป

โครงการวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับเป้าประสงค์และตัวชี้วัดเป้าหมายภายใต้แผนปฏิบัติการด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรมของกรมวิชาการเกษตร โดยเป็นงานวิจัย เทคโนโลยี และนวัตกรรมด้านการเกษตรตรงตามความต้องการของกลุ่มเป้าหมายและถูกนำไปใช้ประโยชน์ และสอดคล้องกับมาตรการและกรอบวิจัยตามแผนปฏิบัติการด้านงานวิจัยและนวัตกรรมกรมวิชาการเกษตร ปี 2564 – 2569 ในมาตรการที่ 5 การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีขั้นสูงเพื่อเข้าสู่เกษตรอัจฉริยะ และเกษตรแห่งอนาคต และกรอบวิจัยที่ 29 กรอบวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตพืชไร่นานาชาติ รวมทั้งสอดคล้องกับทิศทางการดำเนินงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร ในระยะเวลา 3 ปี (ปี 2565 - 2567) ในด้านงานวิจัยเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตพืชด้วยเทคโนโลยีอัจฉริยะ เช่น smart agriculture, digital food และการจัดการระบบเขตกรรมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตพืช เป็นต้น

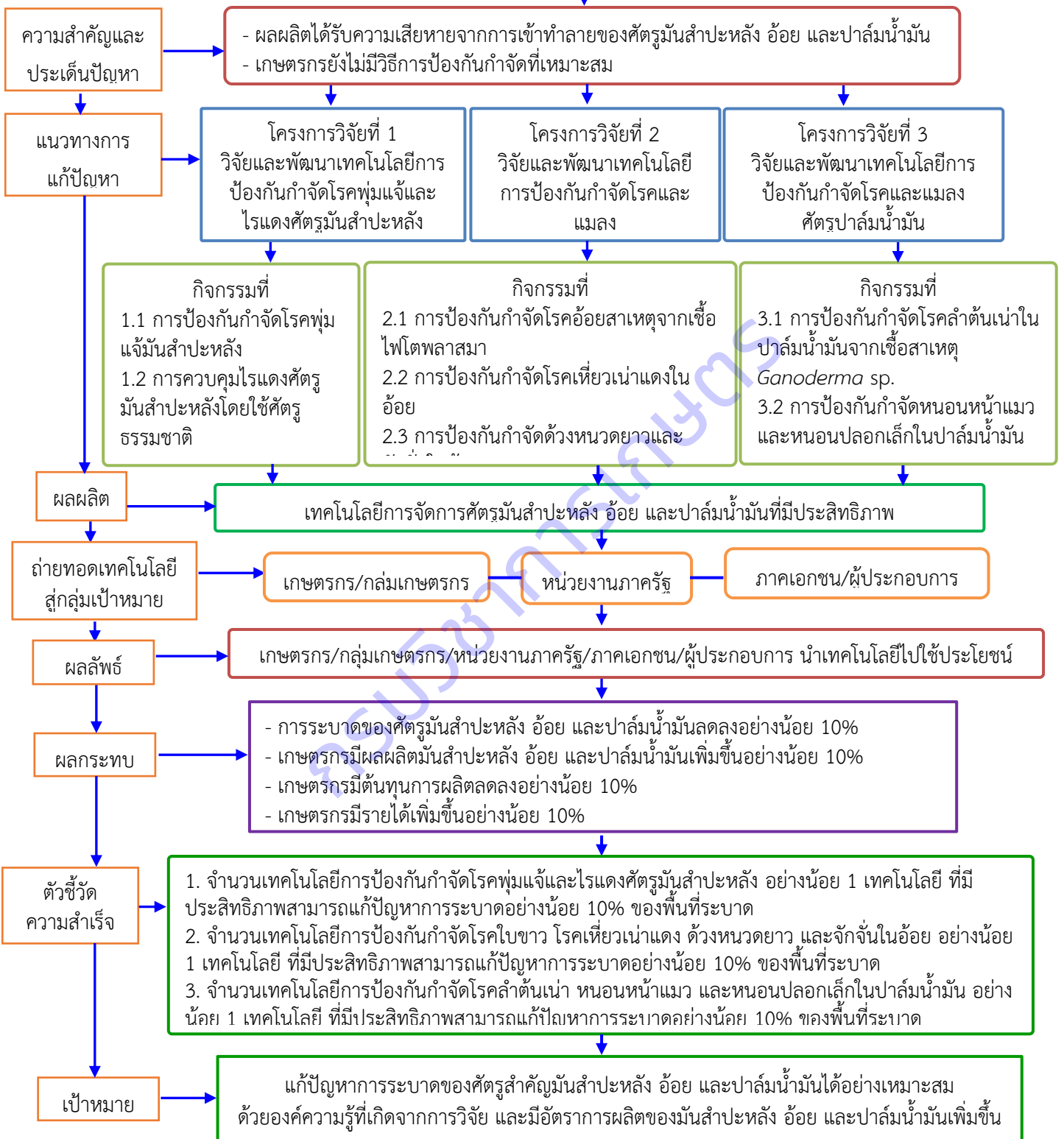
วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง
2. เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว โรคเหี่ยวเน่าแดง ด่างหนวดยาว และจักจั่นในอ้อย
3. เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน

ขอบเขตการศึกษา

โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน ซึ่งประกอบด้วย 3 โครงการวิจัยย่อย ได้แก่ 1) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง 2) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูอ้อย 3) วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน รวมจำนวน 7 กิจกรรม ภายใต้ระเบียบวิธีวิจัยทางการเกษตร ระยะเวลาดำเนินการระหว่าง ปี 2565-2567 ณ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งเป็นหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร และในพื้นที่แปลงเกษตรกรปลูกมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมันที่สำคัญของประเทศ เช่น จังหวัดระยอง ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่นอุดรธานี มุกดาหาร สุพรรณบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท นครสวรรค์ อุตรดิตถ์ สุราษฎร์ธานี สงขลา สระบุรี ปทุมธานี และนครนายก เป็นต้น โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว โรคเหี่ยวเน่าแดง ด่างหนวดยาว และจักจั่นในอ้อย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน โดยมีเป้าหมายคือ แก้ไขปัญหาความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของศัตรูพืชที่สำคัญได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถแก้ปัญหาการระบาดได้อย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ระบาด ช่วยลดต้นทุน เพิ่มผลผลิต และยกระดับการพัฒนาการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมันอย่างยั่งยืนของประเทศต่อไป กรอบการวิจัยของแผนงานวิจัยสรุปได้ดังภาพที่ 1

**แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต
มันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน**



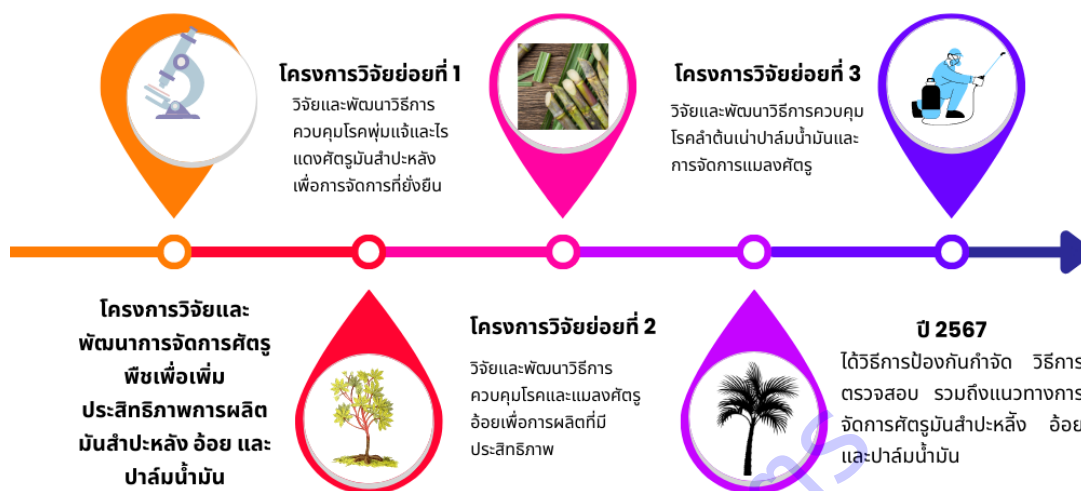
ภาพที่ 1 กรอบการวิจัยของแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์ม

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1. วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนากิจการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์ม น้ำมัน ประกอบด้วย 3 โครงการวิจัยย่อยได้แก่ โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง มุ่งเน้นการศึกษาวิจัยพืชอื่น ๆ ที่มีโอกาสเป็นแหล่งสะสมของเชื้อไฟโตพลาสมา เพื่อการจัดการแปลงที่ยั่งยืน รวมถึงวิธีการปลูกเชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแจ้ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในกระบวนการคัดเลือกพันธุ์ต่อไปได้ในอนาคต การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาที่รวดเร็ว แม่นยำ โดยการพัฒนาเทคโนโลยีสมัยใหม่ได้แก่เทคนิค Multiplex PCR และเทคนิค LAMP ในตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา เพื่อสนับสนุนการผลิตท่อนพันธุ์มันสำปะหลังสะอาด รวมถึงการพัฒนาเพิ่มปริมาณมันสำปะหลังปลอดโรคในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และมีการทดสอบระดับความต้านทานของมันสำปะหลังต่อไรแดง และการประยุกต์ใช้ไรตัวห้ำ เพื่อการควบคุมไรศัตรูพืชเพื่อการลดการใช้สารเคมีลง ในส่วนของโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูอ้อย มุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อยเป็นโรคใบขาวด้วยวิธี Multiplex PCR LAMP และวิธีการทางเซรัมวิทยา รวมทั้งการพัฒนาวิธีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะเพื่อการกระตุ้นความต้านทานและเพิ่มแหล่งของไนโตรเจนเพื่อสร้างความต้านทานโรคของอ้อย รวมถึงการประเมินความต้านทานต่อโรคเหี่ยวเน่าแดงในอ้อยต่อเชื้อราก่อโรคสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน และการพัฒนาวิธีการจัดการแมลงศัตรูอ้อยด้วยการใช้สารชีวภัณฑ์เพื่อการควบคุมด้วงหนวดยาว รวมถึงการศึกษาชีววิทยาของจักจั่นอ้อยเพื่อการจัดการที่ยั่งยืน และโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน มุ่งเน้นการพัฒนาวิธีการควบคุมเชื้อรา *Ganoderma* sp. ที่ก่อโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน คัดเลือกและศึกษาวิจัยการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคลำต้นเน่า รวมถึงการพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมโรค และพัฒนาวิธีการปลูกเชื้อราก่อโรคที่เหมาะสมเพื่อการคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อไปในอนาคต รวมถึงมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มาใช้ในการคัดเลือกปาล์มน้ำมันทนทานโรค อีกทั้งยังพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัดหนอนหน้าแมวและหนอนปลอกเล็กแมลงศัตรูปาล์ม น้ำมันด้วยการใช้สารเคมี เพื่อการจัดการที่ยั่งยืนต่อไป

PROJECT FRAMEWORK



ภาพที่ 1 กรอบการวิจัยของแผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน

นิยามศัพท์

- *Ca. Phytoplasma* หมายถึง เชื้อไฟโตพลาสมา *Candidatus Phytoplasma*
- Polymerase Chain Reaction (PCR) หมายถึง การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง
- Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP) หมายถึง การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้อุณหภูมิคงที่ ใช้ระยะเวลาสั้น
- Sugarcane white leaf (SCWL) หมายถึง โรคใบขาว
- Sugarcane grassy shoot (SCGS) หมายถึง โรคใบแตกกอฝอย
- Sugarcane green grassy shoot (SCGGS) หมายถึง โรคกอตะไคร้
- cross amplification หมายถึง การเกิดปฏิกิริยาข้าม
- secondary metabolite หมายถึง สารทุติยภูมิ
- SDS-PAGE หมายถึง เทคนิคการตรวจขนาดชิ้นโปรตีน

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

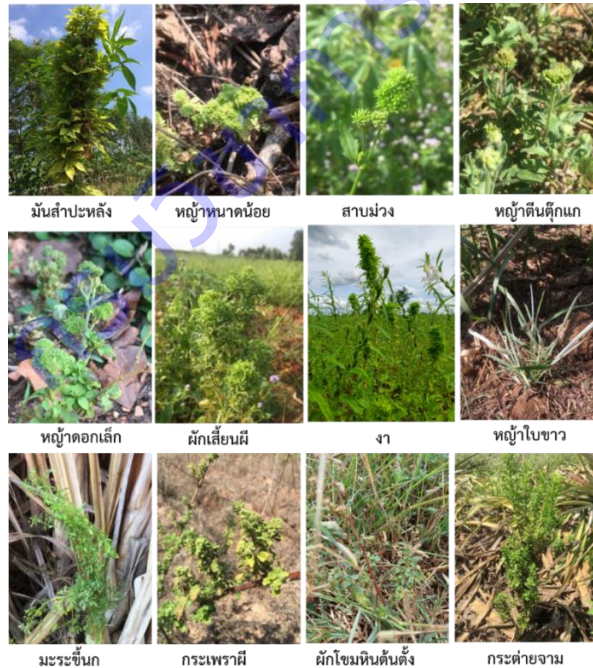
- ไม่มี มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)
- เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....
- เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

บทที่ 3 ผลการศึกษา

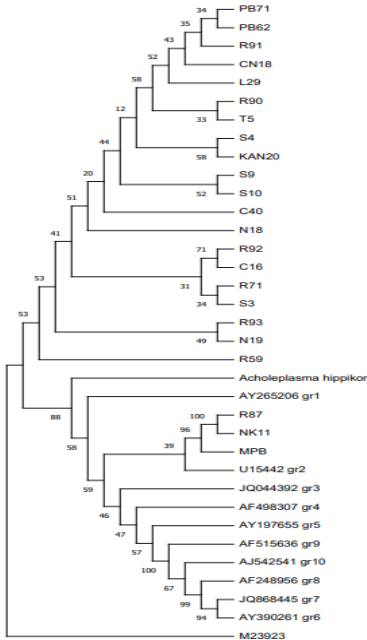
3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชเศรษฐกิจและวัชพืชในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังและพื้นที่ใกล้เคียงในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก กำแพงเพชร ลพบุรี เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ พิษณุโลก ชลบุรี และระยอง จำนวน 10 จังหวัด พบพืชที่แสดงผิดปกติคล้ายกับอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา จำนวน 210 ตัวอย่าง ได้แก่ มันสำปะหลัง งาม หญ้าหนวดน้อย ตีนตุ๊กแก สาบม่วง กระต่ายจาม ผักเสี้ยนผี ไมยราบ มะระขึ้นก ผักโขม หินต้นตั้ง กระเพราะผี หญ้าดอกเล็ก และหญ้าใบขาว (ภาพที่ 2) เมื่อนำตัวอย่างพืชและวัชพืชที่แสดงอาการผิดปกติคล้ายลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา มาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested-PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส จำนวน 210 ตัวอย่าง ในตัวอย่าง 326 ตัวอย่าง และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในตำแหน่ง 16s rRNA จากตัวแทนกลุ่มตัวอย่างพืชและวัชพืช กับข้อมูลยีนเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 10 กลุ่มที่มีรายงานใน Genbank พบว่า R87 (กระต่ายจาม, ระยอง) NK11 (ผักโขม หินต้นตั้ง, นครสวรรค์) และ MPB (ไมยราบ, เพชรบูรณ์) ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาในมะนาว (accession number U15442) โดยเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII และตัวแทนของพืชและวัชพืชชนิดอื่นแยกกลุ่มออกไป (ภาพที่ 3)

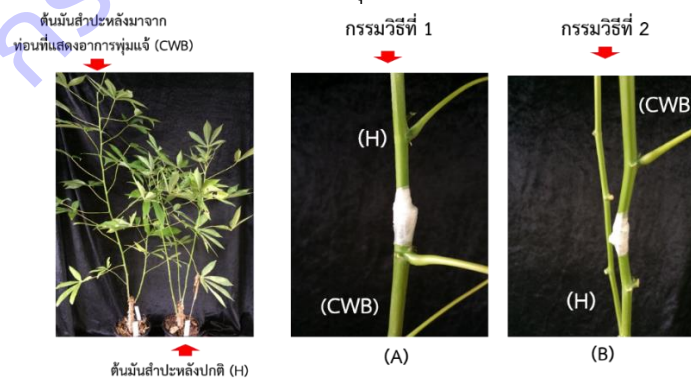


ภาพที่ 2 พืชที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา



ภาพที่ 3 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคม้วนแฉ่งที่พบจากการสำรวจ ปี 2565

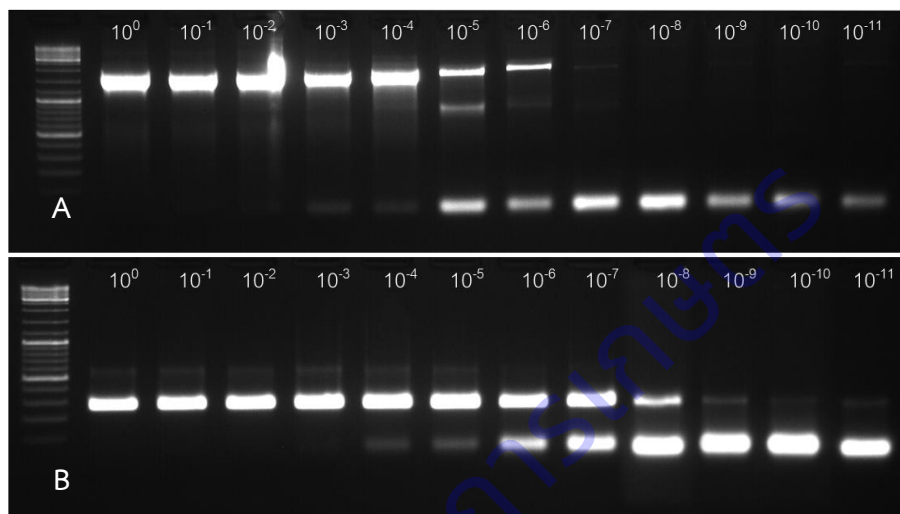
จากการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีต่อกิ่งจากต้นที่เป็นโรคสู่ต้นปกติ และจากต้นปกติไปยังต้นที่เป็นโรคนั้นไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังอีกต้นหนึ่งได้ (ภาพที่ 4) อาจเกิดจากการที่เชื้อไฟโตพลาสมามีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำให้ต้นมันสำปะหลังแสดงอาการผิดปกติ ดังนั้นในการทดลองปี 2566 นั้นมีแผนการดำเนินการคือ นำฝอยทอง *Cuscuta campestris* Yunker และ *Cuscuta chinensis* Lam. นำมาถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคม้วนแฉ่งมันสำปะหลัง เช่นเดียวกับการทดลองของ โสภิตา และคณะ (2560) ที่นำฝอยทองทั้งสองชนิดมาถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคดอกเขียวของแพงพวย และการศึกษาการถ่ายทอดโรคแตงพุ่มฝอยของงาและปอเทืองโดยใช้ฝอยทอง (สุภาพพร, 2534)



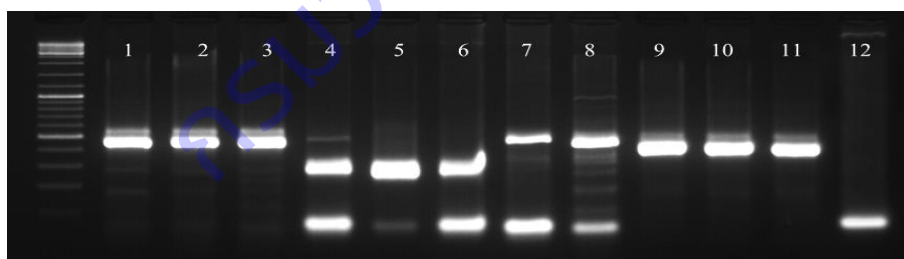
ภาพที่ 4 แสดงต่อกิ่ง 2 กรรมวิธี (A) ต้นตอคือต้นแสดงอาการท้วนแฉ่งต่อกิ่งด้วยต้นปกติ (B) ต้นตอปกติต่อกิ่งด้วยต้นแสดงอาการท้วนแฉ่ง

จากการพัฒนาเทคนิค Multiplex PCR เพื่อการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาจากมันสำปะหลังเป็นโรคม้วนแฉ่งพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะและมีความไวสูง (ภาพที่ 5-6) สามารถจำแนกและตรวจเชื้อไฟโต

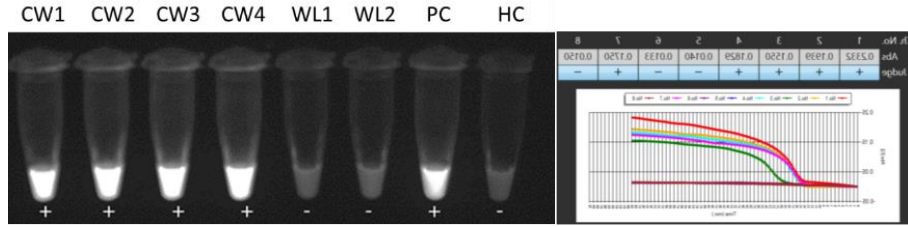
พลาสมาได้สองกลุ่มคือ 16SrI และ 16II เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Nested PCR ส่วนการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแจ้พบว่าไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะสูงโดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย (ภาพที่ 7) และจากการคัดเลือกสารปฏิชีวนะเพื่อการขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าสารปฏิชีวนะจำนวน 2 ชนิดได้แก่ เตตระไซคลิน และโรแฟมพิซิน ที่เข้มข้น 0 50 และ 100 ppm พบว่าทั้งสองความเข้มข้นสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้น 50 ppm มาทดสอบการยับยั้งต่อในปีที่ 2



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบความไววิธีการ Nested-PCR (A) กับ Multiplex-PCR (B) ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้

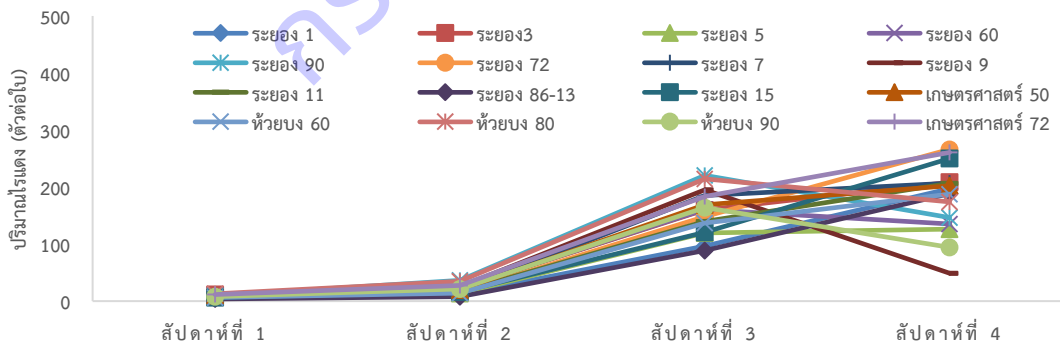


ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบความไวความจำเพาะของ Multiplex-PCR ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้: 1-8 = ตัวอย่างมันสำปะหลัง, 9 = *Vernonia cinerea* 10-11 = *Anaphalis margaritacea* ,12 = มันสำปะหลังปกติ

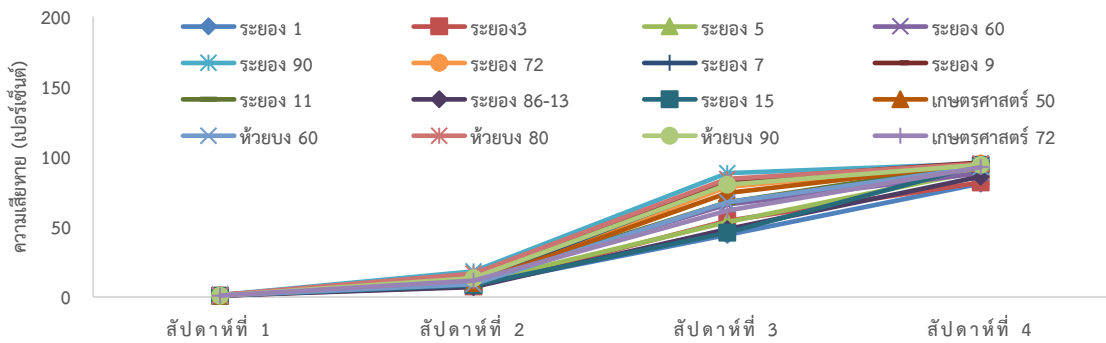


ภาพที่ 7 การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการตรวจวิเคราะห์โรคพุ่มแฉ้มันสำปะหลัง A=ผลของปฏิกิริยา LAMP ภายใต้แสงยูวี B=ผลของปฏิกิริยา LAMP วิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ Myabscope ตัวอย่างโรคพุ่มแฉ้มันสำปะหลัง No.1-4 ตัวอย่างโรคใบขาวอ้อย No.5-6 Positive control No.7และ Healthy control No.8

ในส่วนของการประเมินการเข้าทำลายของไรแดงมันสำปะหลังต่อมันสำปะหลังพันธุ์รับรองและพันธุ์แนะนำพบว่าหลังจากปล่อยไรแดงพบว่า สัปดาห์ที่ 1 มีจำนวนไรแดงเฉลี่ยอยู่ที่ 8.51 ตัวต่อใบ พันธุ์ห้วยบง 80 มากที่สุด 12.832 ตัวต่อใบ ระยะเวลา 13 น้อยที่สุด 3.75 ตัวต่อใบ สัปดาห์ที่ 2 มีจำนวนไรแดงเฉลี่ยอยู่ที่ 20.27 ตัวต่อใบ พันธุ์ระยะเวลา 90 มากที่สุด 36.37 ระยะเวลา 13 น้อยที่สุด 7.72 ตัวต่อใบ สัปดาห์ที่ 3 มีจำนวนไรแดงเฉลี่ยอยู่ที่ 156.36 ตัวต่อใบ พันธุ์ระยะเวลา 90 มากที่สุด 220.50 ตัวต่อใบ ระยะเวลา 13 น้อยที่สุด 88.55 ตัวต่อใบ สัปดาห์ที่ 4 มีจำนวนไรแดงเฉลี่ยอยู่ที่ 181.23 ตัวต่อใบ พันธุ์ระยะเวลา 72 มากที่สุด 266.22 ตัวต่อใบ ระยะเวลา 9 น้อยที่สุด 48.79 ตัวต่อใบ (ภาพที่ 8) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความเสียหายพบว่า สัปดาห์ที่ 1 ทุกพันธุ์มีความเสียหายน้อยมากเฉลี่ยเท่ากับ 1.12 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 2 มีความเสียหายเฉลี่ยอยู่ที่ 11.06 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ระยะเวลา 90 มากที่สุด 18.33 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 13 น้อยที่สุด 7 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 3 มีความเสียหายเฉลี่ยอยู่ที่ 67.34 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ระยะเวลา 90 มากที่สุด 88.33 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 1 น้อยที่สุด 44.16 เปอร์เซ็นต์ สัปดาห์ที่ 4 มีความเสียหายเฉลี่ยอยู่ที่ 91.61 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ระยะเวลา 9 มากที่สุด 95.83 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 1 น้อยที่สุด 80.83 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9)



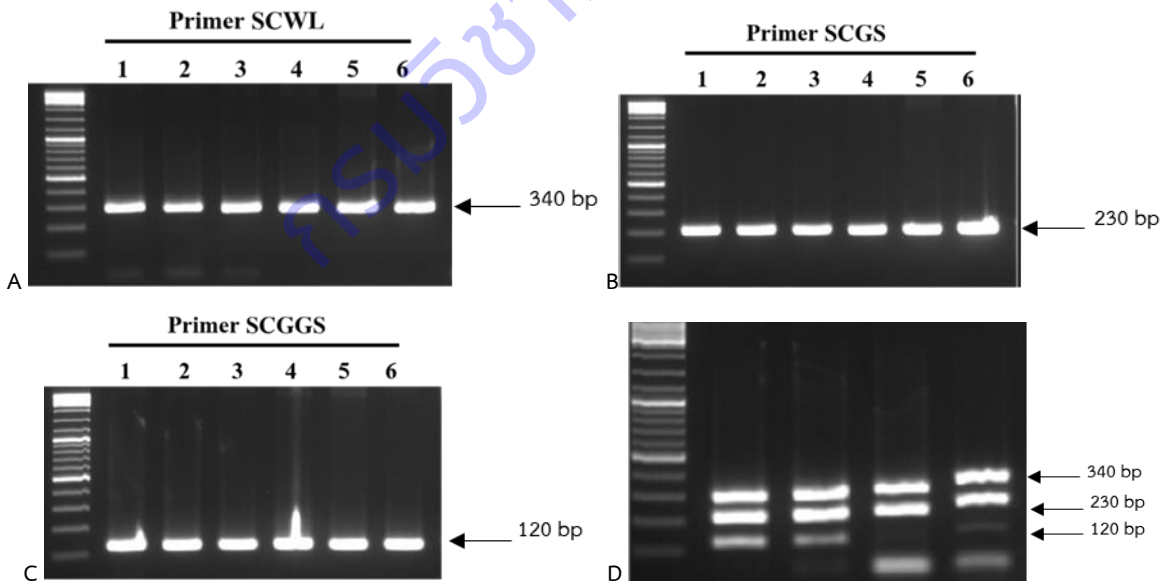
ภาพที่ 8 จำนวนไรแดงมันสำปะหลังในสัปดาห์ที่ 1 - 4 หลังปล่อยบนต้นมันสำปะหลัง 16 พันธุ์



ภาพที่ 9 ระดับความเสียหายในสัปดาห์ที่ 1 – 4 หลังปล่อยไรแดงมันสำปะหลังบนต้นมันสำปะหลัง 16 พันธุ์

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูอ้อย

การพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยที่มีความแม่นยำ ออกแบบไพรเมอร์ ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบจากยีนเป้าหมายบริเวณ 16S-23S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย จำนวน 3 คู่ ได้แก่โรคใบขาว SCWL-F/ SCWL-R ขนาด 340 คู่เบส ค่า Tm 58 °C โรคใบแตกกอฝอย SCGS-F/SCGS-R ขนาด 230 คู่เบส ค่า Tm 60 °C โรคกอตตะไคร้ SCGGS-F/ SCGGS-R ขนาด 120 คู่เบส ค่า Tm 59 °C (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ขนาดขั้วยีนของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยด้วยเทคนิค multiplex PCR A) Sugarcane white leaf genomic DNA B) Sugarcane grassy shoot genomic DNA C) Sugarcane green grassy shoot genomic DNA D) Amplification of 3 phytoplasma genomic DNA

ผลการทดสอบสถานะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex-PCR ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer A (500mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 9.1 at 20 °C) and 0.1% Triton™ X-100; Vivantis), 0.2 µM dNTP Taq DNA polymerase (Vivantis) ความเข้มข้น 0.1 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 µM และ DNA template ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม โดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา โดยกำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ นำดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายมาปรับความเข้มข้นเป็น 25 ng/µl และเจือจางที่ระดับ 10-10¹¹ ตรวจสอบด้วยเทคนิค Multiplex PCR เจือจางดีเอ็นเอความเข้มข้นตั้งต้นที่ 25 นาโนกรัม ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 10 เท่า จากเริ่มต้นที่ 1 ถึง 10⁻¹¹ Multiplex-PCR สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 10⁻⁶ ในคู่ไพรเมอร์ SCWL และ SCGS ส่วน ไพรเมอร์ SCGG สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 10⁻⁴ เปรียบเทียบกับวิธี nested PCR สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดที่ความเข้มข้น 10⁻¹¹

ผลการนำตัวอย่างอ้อยมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยทดสอบการ cross amplification กับไฟโตพลาสมาในพืชชนิดอื่น ๆ ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว จำนวน 2 ตัวอย่าง โรคใบขาวแตกกอฝอย จำนวน 2 ตัวอย่าง โรคยอดแคระ จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างอ้อยใบเขียวไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างอ้อยที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา เช่น โรคใบลวก จำนวน 2 ตัวอย่าง อาการขาดธาตุไนโตรเจนจำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่า เทคนิค Multiplex-PCR มีความจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคทั้งสามโดยไม่ทำปฏิกิริยากับโรคใบลวกและพืชที่มีอาการขาดธาตุ และดีเอ็นเอพืชปกติ จากการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างอ้อยใบเขียวไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่ามีการติดเชื้อใบขาวทั้งหมดและมี 2 ตัวอย่าง ที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวและโรคใบขาวแตกกอฝอย (ตารางที่ 1)

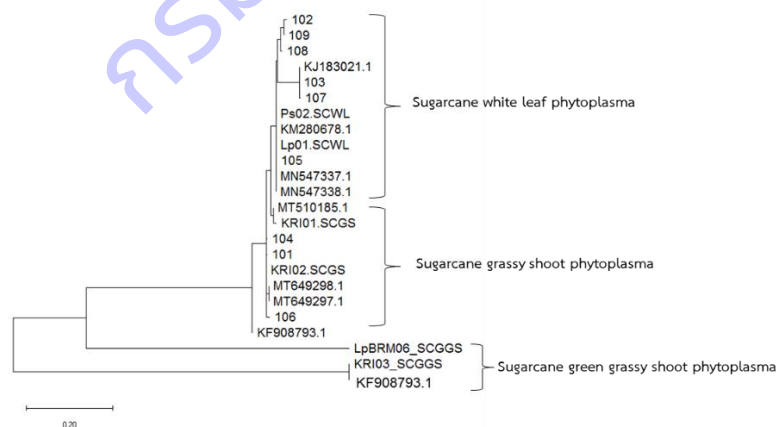
ตารางที่ 1 การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบอ้อยด้วยเทคนิค Multiplex PCR.

Sample DNA=25 ng/ul (pipet 3ul)	Multiplex-PCR detection		
	SCWL 340bp	SCGS 230bp	SCGG 120 bp
101	+	+	-
102	+	-	-
103	+	-	-
104	+	+	-
105	+	-	-
106	+	+	-
107	+	-	-
108	+	-	-
109	+	-	-
111	+	-	-
112	+	-	-
113	+	-	-
114	+	-	-
115	+	-	-

Sample DNA=25 ng/ul (pipet 3ul)	Multiplex-PCR detection		
	SCWL 340bp	SCGS 230bp	SCGG 120 bp
116	+	-	-
117	+	-	-
118	+	-	-
119	+	-	-
120	+	-	-
Leaf scald1	-	-	-
Leaf scald2	-	-	-
Glassy shoot1	-	+	-
Glassy shoot2	-	+	-
Green glassy shoot1	-	-	+
Green glassy shoot2	-	-	+
White leaf1	+	-	-
White leaf2	+	-	-
Physio-disorder1	-	-	-
Physio-disorder2	-	-	-

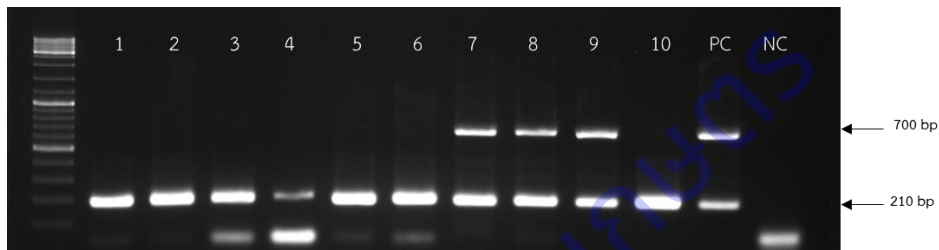
+ = infected, - = uninfected

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากการแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ white leaf: SCWL, grassy shoot : SCGS และ green grassy shoot : SCGG ลำดับนิวคลีโอไทด์ 340 bp 230bp และ 120 bp เมื่อเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลทของไทยที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อ white leaf: SCWL คล้ายคลึงกันกับข้อมูล KJ18021.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ grassy shoot : SCGS มีค่าความคล้ายคลึงกับข้อมูล MT510185.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และที่ green grassy shoot : SCGG มีค่าความคล้ายคลึงกันกับข้อมูล KF908793.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 11)

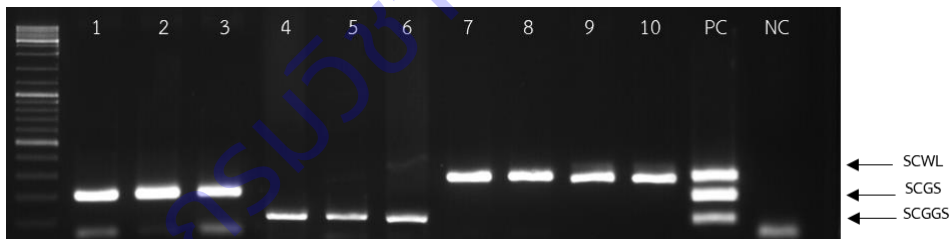


ภาพที่ 11 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ 16S rRNA gene sequences ของเชื้อ Phytoplasma สาเหตุโรคอ้อย The bar represents the phylogenetic distance of 5 %. Numbers on branches are confidence percentage obtained from 1,000 bootstrap replicates.

ผลการเปรียบเทียบกับวิธี multiplex-PCR และวิธี Nested-PCR ตามวิธีการของ Hanboonsong *et al.* (2005) ที่นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย พบว่า วิธี Nested-PCR ทุกตัวอย่างดีเอ็นเอพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีนขนาด 210 bp จำนวน 10 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อสูงจะเพิ่มชิ้นยีนได้ขนาด 700 bp และ 210 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 12) โดยวิธี multiplex-PCR สามารถตรวจสอบเพิ่มปริมาณชิ้นยีนขนาด 340 bp จำนวน 5 ตัวอย่าง แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาว เพิ่มปริมาณชิ้นยีนขนาด 230 bp แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวแตกกอฝอย และเพิ่มปริมาณชิ้นยีนขนาด 120 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 13) จากการทดสอบนี้พบว่าวิธี Multiplex-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยได้ และสามารถจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อได้ยังลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาเพียงรอบเดียว



ภาพที่ 12 ผลการตรวจโรคไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยด้วยวิธี Nested-PCR. 1-10 = sugarcane sample, 11= positive control, 12 = negative control.



ภาพที่ 13 ผลการตรวจโรคไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยด้วยวิธี Multiplex PCR. 1-3 = white leaf: SCWL, 4-6 = grassy shoot: SCGS, 7-10 = green grassy shoot: SCGGs 11= positive control, 12 = negative control.

การพัฒนาเทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจโรคใบขาวอ้อยที่รวดเร็ว การใช้วิธีทางด้านอณูชีววิทยาโดยเทคนิค PCR แม้จะเป็นที่นิยมและ ใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่การใช้เทคนิค PCR ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะ หลายขั้นตอน ผู้วิจัยต้องมีการมีประสบการณ์ มีความยุ่งยาก ต้นทุนสูง และใช้เวลานาน ต่อมาใน ปี คศ. 2000 Notomi *et al.* (2000) ได้พัฒนาเทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดโดยมีหลักการพื้นฐานคล้ายกับการทำ PCR ชื่อว่า Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP) โดยเทคนิค LAMP จุดเด่นของเทคนิคนี้ คือ ชุดของ primer โดย 1 ชุด มีจำนวน 4 เส้น (รวมทั้งด้าน Forward และ Reverse) ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน primer ต้องออกแบบอย่างจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย (target sequence) จำนวน 6

บริเวณ โดย primer ประกอบไปด้วย inner primers จำนวน 2 เส้น (FIP และ BIP) ทำหน้าที่สร้าง loop และ outer primers จำนวน 2 เส้น (F3 และ B3) ทำหน้าที่ช่วยให้เกิด strand displacement สมบูรณ์ตลอดสาย ทั้งนี้ outer primer จะถูกใช้เพียงใน Initial step เท่านั้นและนอกจากนี้ยัง พบว่า การเพิ่ม loop primers เข้าไปช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น

แหล่งที่มาของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวและการเตรียมตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาว ตัวอย่างจากแปลงปลูกอ้อยจังหวัดขอนแก่น ที่แสดงอาการใบขาว ใบขาวเขียว ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค direct PCR แล้วคัดเลือกตัวอย่างอ้อยที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว ได้ จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างศึกษาอื่น imp พบว่าตัวอย่างอ้อยที่ให้ผลบวก จึงได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,250 bp บริเวณ immunodominant membrane protein (Imp) ของจีโนมเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดขอนแก่นมีความใกล้เคียงกับส่วน imp ของเชื้อไฟโตพลาสมา *Candidatus Phytoplasma* (BAH24241.1) มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 92 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อต่อไป

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน imp จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว มาทำการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมา ออกจากเชื้อไฟโตพลาสมายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น Sugarcane green glassy shoot และ Sugarcane glassy shoot ได้มีตำแหน่งการเข้าจับที่ตำแหน่งเบส 380 ถึง 890 บน ยีน imp และมีค่า Melting Temperature (Tm) ของเส้นไพรเมอร์ B3, F3, BIP และ FIP อยู่ที่ 50°C 52°C 66°C และ 66°C ตามลำดับ (ภาพที่ 14)

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP จากการทดสอบนี้ใช้น้ำยาสำเร็จรูป LavaLamp DNA Master Mix (Lucigen) โดยปฏิกิริยาที่เหมาะสมใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอต้นแบบสำปะหลังที่มีความเข้มข้น (15ng) โดยมีส่วนประกอบ LavaLamp DNA Master Mix (1x) Green Fluorescent Dye (0.1X) ไพรเมอร์ประกอบด้วย final concentration คือ 0.2 μM Outer primer (F3, B3), 1.6 μM Inner primer (FIP, BIP), 0.4 μM loop primer (Loop F and R) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาแบบ Realtime โดยเครื่อง Myabscope® (ภาพที่ 15)

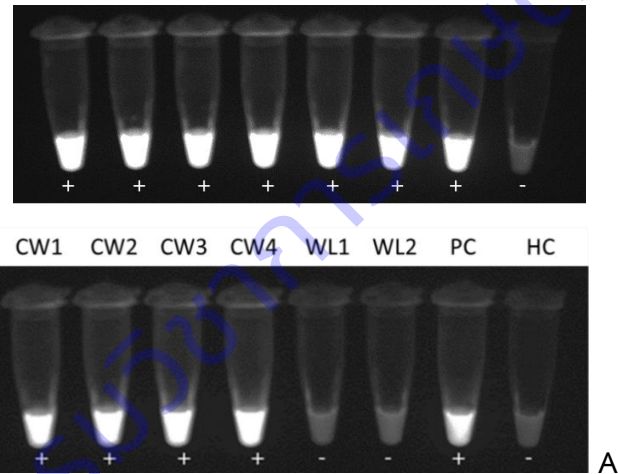
ผลการทดสอบหาความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยโดยเปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ พบว่า ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยโดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ในมันสำปะหลัง

```

CTCAAAGATTGCAAACGATGAAATCTTTATAAAAAATTTAAAAAATAAATAATTTGTTAATGTTTTTTA
TTGAATTGCTAAATATGTTATAATTATGGTATTGAATCTTTATAAAAAAGATTTAATAATAAAATAATACAA
AAAGATTAATATAGGAGGAAAAATAAAAAATATATTATGCAAAATGAAAAATTTGGTACACAAAAAAGGTA
TAACTATTATGTCATCTGTAGTTGTTGGTTTTTAGCAATTTACTAATTATGTTTATTATTTCAGATGGTGGCC
TTTCCAAAF1AACTAAACGAAAAGACAATAAAAAATTTGAAAAAGAAATAGTACF2TAAAAGTGAACAGAA
GAAGACGTTTCAGATCGGGATAAAGCTGAAAAAGCTTTAAAAGALoop FATTAAGCAAAAAATCTCAAATAGAGA
AATTGTTAGGAATAGTTGAAAAACATAATAAAAAAGCAAGATGACAAAAATAAAGACACAACAATTGA
AGCATTAATTCAAATTGTAATALoop BTCAATAAATGAACTAAAAGTAGAAAAB1PCTAGTTATGTCAAATCTGACTTTAA
AGACAAATACAATTCAGCAGCTGATTCATB3TAAATATCCAATGCTTTGCAAGCTTAAAAAGTGATTAGAAAT
TAAATAAATAATTTAAAAATTAATTTATTTTATTTAAAAATTAATTCCTTTTTTTAAAAAAGTAAAAAAA
TATGCTTTGCAATTTTTTTTTTATTACTATTAACCTTTTTTATAGCGGAAATATAAACCTTTAAATAGA
GGATGAGGTTAAAAGCCTAGATAAAAAATCCGGATGAAATTGAACAGCAACAACTAATGTTTTTTAA
CTCTATAATTTCAACAAATCTCTCT

```

ภาพที่ 14 ตำแหน่งไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา LAMP



ภาพที่ 15 ผลของปฏิกิริยาแลมป์ภายใต้แสงยูวี

การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเหตุโรคใบขาวในอ้อยอย่างง่ายด้วยเทคนิคทางเซรัมวิทยา จากการศึกษา Imp protein เป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ และอยู่ด้านนอกเซลล์ไฟโตพลาสมา Imps protein จัดได้เป็น 3 ประเภท คือ Immunodominant membrane protein (Imp), Immunodominant membrane protein A (IdpA) และ antigenic membrane protein (Amp) และพบว่าแอนติบอดีต่อ Imps ของเชื้อหลายกลุ่มโดยเฉพาะในกลุ่ม 16SrI (aster yellows groups) และ 16SrXI (rice yellow dwarf group) มีศักยภาพในการใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีเพราะมีปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นที่พบในเชื้อไฟโตพลาสมา (Kakizawa *et al.*, 2009)

ออกแบบไพรเมอร์ยีน IMP จากลำดับเบสในงานวิจัยของ Kakizawa *et al.* (2009) และจากงานวิจัยของ ศุภรัตน์ และคณะ (2020) และนำดีเอ็นเอที่มี 3 เชื้อ ได้แก่ SCWL, SCGS, SCGG มาสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณนำไปหาลำดับเบสด้วยวิธี Sequencing ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรม Clustalx2 MEGA-X, Tm calculator ซึ่งออกแบบใช้ในการคัดเลือก 3 ตำแหน่ง เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ

ผลจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน imp จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย แก่ได้ Sugarcane white leaf, Sugarcane green glassy shoot และ Sugarcane glassy shoot สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ ไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย

Primers	Sequence (5'-3')
IMP2F	GGTAAAATAGCTATTATTACAT
IMP2R	ATGTTTCAATTGTTGCGTCTTTT

ตัวอย่างจากแปลงปลูกอ้อยจังหวัดขอนแก่น ที่แสดงอาการใบขาว ใบขาวเขียว ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค direct PCR นำไปทำการทดสอบตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิด โดยมีสภาวะในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 15 ไมโครลิตร ต่อ หนึ่งหน่วยตัวอย่าง ประกอบด้วย 1x PCR buffer A (500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 9.1 at 20°C) , 0.1% Triton™ X-100; Vivantis), 0.2 μM dNTP, 0.1 u Taq DNA polymerase (Vivantis) 0.5 μM Imp primer สังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์ กำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วคัดเลือกตัวอย่างอ้อยที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว ได้ จำนวน 10 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างศึกษา yin imp พบว่าตัวอย่างอ้อยที่ให้ผลบวก จึงได้ทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,000 bp บริเวณ Immunodominant membrane protein (Imp) ของจีโนมเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดขอนแก่นมีความใกล้เคียงกับส่วน imp ของเชื้อไฟโตพลาสมา *Candidatus Phytoplasma (BAH24241.1)* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวเพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อต่อไป

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน IMP ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน IMP จำนวน 262 เบส (base) มีความแตกต่างกัน 22 ตำแหน่ง และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 จะได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.0037 – 0.01993 distance จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรม 4 วิธี โดยทดสอบวิธีการจัดกลุ่มทุกวิธี คือ maximum likelihood, maximum parsimony, neighbor joining และ UPGMA แล้วเลือกวิธีการจัดกลุ่มที่ให้ผลการ

จำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นโรคเป็นใบขาวที่มีอาการเป็น ขาว ได้แก่ โรคใบขาว (sugarcane white leaf: SCWL) โรคใบขาวร่วมกับอาการกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) ทั้งสองโรคนี้อ้อยมีสีขาวยกับ ขาวปนเขียว กลุ่มที่ 2 โรคกอตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGS) โรคนี้อาการใบอ้อยจะไม่มีสีขาวยแต่แสดงอาการโดยแตกกอตะไคร้

ทดสอบโดยตรวจในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา และอ้อยปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอในอ้อยที่มีอาการใบขาว ใบเขียว และใบเขียวปนขาว ที่ได้ชัดเจน และไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคพุ่มแจ้ และอ้อยปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แสดงถึงความจำเพาะและถูกต้องของยีนที่ได้และเครื่องหมายโมเลกุลที่พัฒนาขึ้น (ภาพที่ 16)

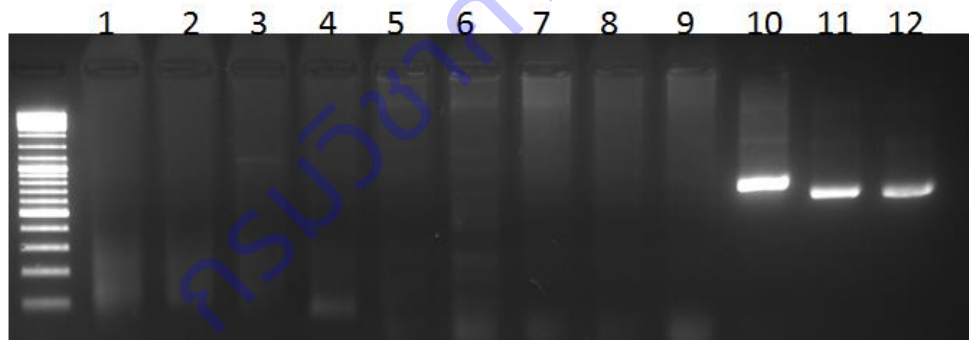
ผลการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 300 bp นี้สามารถแปลเป็นลำดับอะมิโนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุใบขาวอ้อย จำนวน 249 อะมิโน ดังนี้

```
FNKIICMFFYIAKLCYNYGIESLKKINKYKINIGGKIKNILCKMKIFGTQKKVLLLLHLQLLVFQFYLLIINGGLFQKHTK
RQKNLKKKYLVQKKKFQMQIKLKKLNKEKSLKRNCELKNIKKAQLTKKKTQQLKHLIQLNQMNKINLIILNLILK
TNTIQLIHLNYPLLFQTKVIKLNKFNIFLLFKIYFFFFKVKKICKSIFFFLTIKTFFLKKNLCKKGLNSGKLOHNPTIV
FTSISQN (ภาพที่ 17) เมื่อนำไปเทียบกับข้อมูลสากล พบว่าเป็นโปรตีนของไฟโตพลาสมาในอ้อย มีส่วนที่
เหมือนกับ hypothetical protein ของไฟโตพลาสมาในอ้อยที่ 80 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน สอดคล้องกับผลของยีน
ขนาด 800 คู่เบส โดยพบว่า สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ตามที่ขนาดออกแบบ (ภาพที่ 18 และ 19)
```

ผลการโคลนยีน imp จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ คู่ Primer IMP2F / IMP2R และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ โดยวิธี electrophoresis สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เทคนิค gel elution ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Promega, USA) นำชิ้นยีนที่ทำบริสุทธิ์มาเชื่อมกับ เวกเตอร์ pTZ57R/T vector และเคลื่อนย้ายพลาสมิดที่มียีน imp เข้าสู่ component cells เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ด้วยวิธี Heat shock transformation ทำการ คัดเลือกเชื้อที่มียีนในอาหารแข็ง LB ที่มี X-gal และ 50 mg/L แอมพิซิลลิน โดยวิธี spread plate เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 16 ชั่วโมง เชื้อเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวมา streak ในอาหาร แข็ง LB ที่มี 50 mg/L แอมพิซิลลิน และ เชื้อเชื้อส่วนที่เหลือมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ ได้ รับยีนเข้าไปตรวจสอบยีนโดยวิธี PCR ที่ใช้ คู่ primer IMP2F / IMP2R แล้วนำผลผลิต PCR ตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis นำเชื้อไปเลี้ยงเพิ่มจำนวน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C ในกลีเซอรอล 50 %

นำโคลนที่ได้ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 (DE3) มาชักนำการผลิตโปรตีน โดยการเลี้ยงเซลล์จากโคลนที่ได้จำนวน 4 โคลน ในอาหารเหลว 2X-YT ที่เติม Kanamycin 50 mg/L นานข้ามคืน จากนั้นนำเชื้อที่ เลี้ยงได้ซึ่งถือเป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) ย้ายลงอาหารใหม่ด้วยอัตราส่วน 1:100 (V/V) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีค่า O.D. ประมาณ 0.4 และชักนำการผลิต Recombinant RLF-IMPโดยการเติมสาร IPTG ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1mM นำไปเขย่าต่อที่ ความเร็ว 250 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บตะกอนเชื้อทุก 2 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ที่ 0 ชั่วโมง (เติม IPTG), 2, 4, 6 และจนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ชักนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์โดยเทส่วนของอาหารทิ้งและเก็บตะกอน เซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

จากนั้นนำตะกอนมาละลายบนน้ำแข็ง นาน 15 นาที เติมน้ำบัฟเฟอร์ A , pH 8.0 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 6M GuNaCl) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ค่อย ๆ ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงพยายามอย่าให้เกิดฟอง นำมาควนบน magnetic stirrer เบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่ได้มาไหลผ่าน Ni-NTA Agarose resin column (แพ็คคอลัมน์ Ni-NTA Agarose resin โดยใช้ miracloth รอง วางไว้ให้ resin เช็ดตัวให้ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปล่อยให้ส่วนน้ำใสไหล และ ล้างคอลัมน์ด้วย washing buffer C, pH 6.3 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M Urea) ปริมาตร 10 เท่าของ Ni-NTA Agarose resin ที่เช็ดตัว) นำสารละลายโปรตีนมาผ่านคอลัมน์เบาๆพยายามอย่าให้ resin ฟุ้ง ปล่อยให้ส่วนน้ำใสไหล และล้างด้วย washing buffer C, pH 6.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 5 ครั้ง (ครั้งละ 1 มิลลิลิตร) จากนั้น elute ด้วย elution buffer E, pH 4.5 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8M Urea) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 10 ครั้ง (ครั้งละ 1 มิลลิลิตร) เก็บสารละลายโปรตีนจาก elute buffer นำสารละลายโปรตีน ที่ได้มาตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Sodium dardosyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) บน15% acrylamide gel นำเจลไปย้อมสีซึ่งมีส่วนผสมของ Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือนานข้ามคืน และล้างสีส่วนเกินออกด้วยสาร Destaining solution จนกว่าจะเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน จึงหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่เจลในน้ำและนำไป วิเคราะห์แถบโปรตีนคำนวณขนาดของ RLF-IMP protein โดยการเปรียบเทียบกับขนาดของโปรตีนมาตรฐาน (Protein Molecular Weight Marker) (Laemmli *et al.*, 1970) เก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้งานต่อไป



ภาพที่ 16 ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Primer IMP หมายเลข (1-5) ไปอ้อยจากห้องเพาะเลี้ยง (6-9) ไปมันสำปะหลังที่เป็นโรค (10-12) SCWL, SCGS และ SCGGG

hypothetical protein ['Saccharum officinarum' phytoplasma SCGS]

Sequence ID: [WP_153369032.1](#) Length: 162 Number of Matches: 1

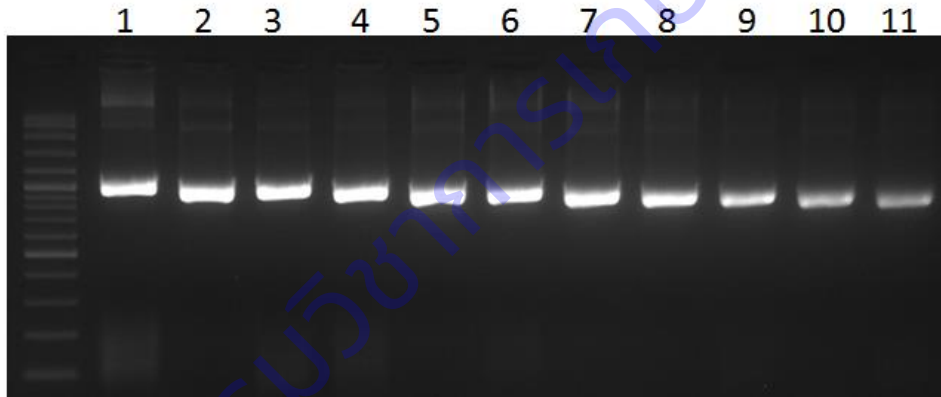
[See 1 more title\(s\)](#) ▾

Range 1: 1 to 160 [GenPept](#) [Graphics](#)

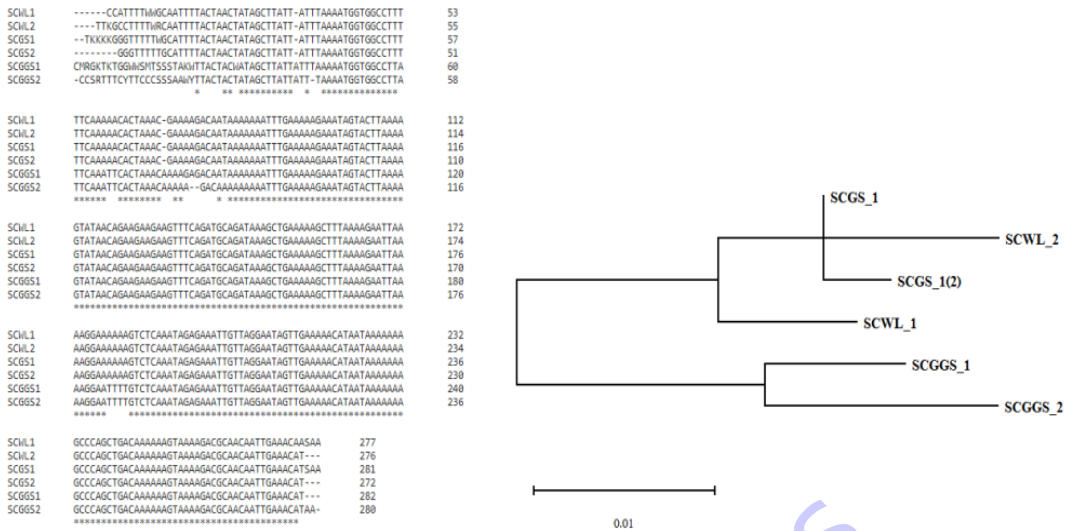
▾ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
196 bits(499)	2e-59	Compositional matrix adjust.	128/161(80%)	140/161(86%)	1/161(0%)	+3
Query 150	MQNEFWYTKKGGKIAIITSSVVGFLAILLTIAYYLKXWPFKTLNEKTIKKFEKEIVLKS					329
Sbjct 1	MQNE FWYTKKG I II S VVGFLAILL+ YY + WPF K LNEKTIKKFEKEIVLKS					59
Query 330	ITEEEVSDADkaekalke1kgkksQIEKLLGIVEKHNKSPADKKVKDATIETFNSIVKS					509
Sbjct 60	+TE+EVSDADKAELK K SQI KLL I+EKHNKKS DKK+KDATIE FNSIVKS					119
Query 510	VTEDEVSDADKAEKVLKELKAKNSQIGKLEIEKHNKSKDDKKIKDATIEAFNSIVKS					
Query 510	IDELKVDKSNYTKSDFKDKYNLAADSSKLSTAFSNLKSLE					632
Sbjct 120	I+ELKV+KS+Y KSDFKDKYN AADS+KLS AF++LKSLE					160
Sbjct 120	INELKVEKSSYVKSDFKDKYNSAADSTKLSNAFASLKSLE					160

ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบลำดับโปรตีนของยีน IMP พบว่า มีส่วนที่เหมือนกับ hypothetical protein ใน Saccharum ถึง 80 เปอร์เซ็นต์

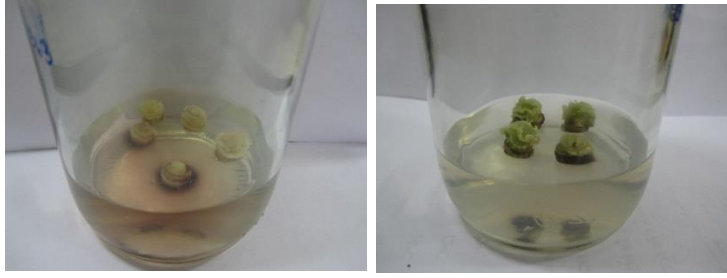


ภาพที่ 18 ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Primer IMP หมายเลข (1-4) SCWL (5-8) SCGGS (9-11) SCGS SCW, SCGS, SCGGS

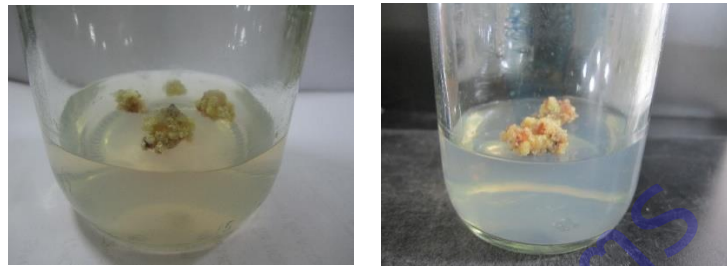


ภาพที่ 19 ผลการวิเคราะห์ Phylogeny และ ค่า Diversity ของนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย

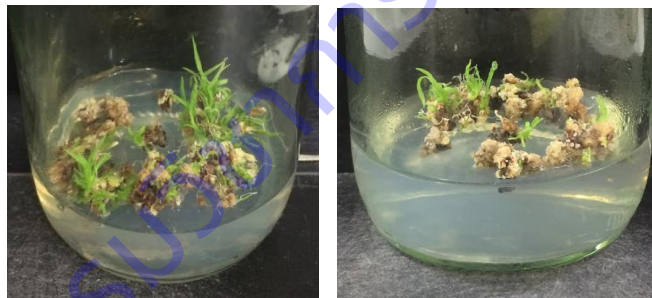
การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในสภาพเนื้อเยื่ออ้อย ผลคัดเลือกต้นอ้อยเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คัดเลือกต้นอ้อยที่มีอายุประมาณ 1 เดือน ความสูงประมาณ 20 เซนติเมตร ตัดใบเพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อ ใช้ต้นที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/μl ระดับสีส้ม และต้นที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/μl ระดับสีฟ้า ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยโดยการชักนำผ่านแคลลัส จากการตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า หน่อที่ 7 8 และ 9 อยู่ในระดับเชื้อที่เหมาะสมจึงนำมาทำการทดลองครั้งนี้ โดยนำชิ้นส่วนหน่ออ้อยที่ตัดเป็นท่อนมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox (6% w/w) ที่ความเข้มข้น 30% ที่เติม Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นซึบน้ำด้วยการดาษปลอดเชื้อแล้วปลูกเปลือกหุ้มออกประมาณ 3-4 ชั้น หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางบนอาหาร Murashige and Skoog's สูตร MSC ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L และ kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/L เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงย้ายลงในอาหารสูตร MSC2 ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L และ casein ความเข้มข้น 300 mg/L เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากขึ้น เมื่อได้ประมาณแคลลัสที่มากพอจึงย้ายลงอาหารสูตร MSS1 ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 mg/L และ NAA ความเข้มข้น 0.25 mg/L เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นอ้อย และเมื่อได้ต้นอ้อยแล้วนำไปเพิ่มจำนวนต้นด้วยอาหารสูตร MSS2 ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/L และ kinetin ความเข้มข้น 2 mg/L เมื่อได้แคลลัสจากอ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/μl อยู่ที่ระดับสีส้ม และต้นที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/μl อยู่ที่ระดับสีฟ้า นำชิ้นส่วนแคลลัสไปเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร MSC2 เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากขึ้น และนำแคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MSS1 เพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้น เมื่อได้ต้นอ้อยแล้วนำไปเพิ่มขยายจำนวนต้นด้วยอาหารสูตร MSS2 (ภาพที่ 20A – 20D)



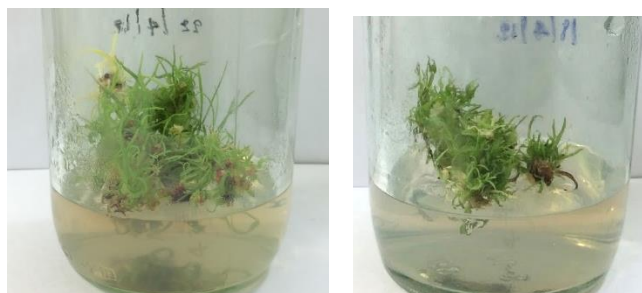
ภาพที่ 20A แสดงแคลลัสที่ได้จากการฟอกฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSC



ภาพที่ 20B แสดงการขยายแคลลัส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSC2



ภาพที่ 20C แสดงการชักนำให้เกิดขึ้นของ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSS1 อายุประมาณ 1 เดือน



ภาพที่ 20D แสดงการชักนำให้เกิดขึ้นของ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSS1 อายุประมาณ 2 เดือน

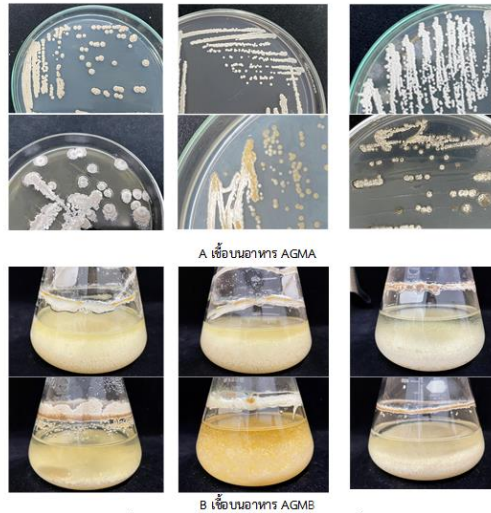
การทดสอบประสิทธิภาพสาร secondary metabolite ของเชื้อ *Streptomyces rochei* ในการยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย ผลจากการแยกเชื้อ *Streptomyces* จากตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อยในแปลงปลูกอ้อยพื้นที่จังหวัดขอนแก่น แยกเชื้อบนอาหาร AGMA สามารถแยกเชื้อได้จำนวน 6 ไอโซเลต (ภาพที่ 21) นำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบอ้อย ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอ้อยในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต 2 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* ได้ดีที่สุด เฉลี่ย 38.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเชื้อ *Streptomyces* spp. ไอโซเลต 1 เฉลี่ย 30.92 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมมีการเจริญของเส้นใยเชื้อรา 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความต่างแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) (ภาพที่ 22) นำเชื้อไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพนำไปเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* โดยนำเชื้อ *Streptomyces* มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Arginine glycerol mineral salt agar (AGMA) 7 วันแล้วไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว Arginine glycerol mineral salt broth (AGMB) เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วันนำมากรองแยกส่วนของเซลล์และน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กระดาษกรอง Whatman #1 ที่ปลอดเชื้อ ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อนำมากรองผ่านเครื่องกรองแบคทีเรียขนาด 0.45 ไมครอน ได้สาร secondary metabolites

จากการตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า หน่อที่ 7 8 และ 9 อยู่ในระดับเชื้อที่เหมาะสมจึงนำมาทำการทดลองครั้งนี้ โดยนำชิ้นส่วนหน่ออ้อยที่ตัดเป็นท่อนมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox (6% w/w) ที่ความเข้มข้น 30% ที่เติม Tween 20 ประมาณ 2-3 หยด เขย่าเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นซับน้ำด้วยการดาชปลอดเชื้อแล้วปลูกเปลี่ยนหุ้มออกประมาณ 3-4 ชั้น หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ วางบนอาหาร Murashige and Skoog's สูตร MSC ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/L และ kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/L เพื่อชักนำให้เกิดเป็นแคลลัสเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อได้แคลลัสแล้วจึงย้ายลงในอาหารสูตร MSC2 ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/L และ casein ความเข้มข้น 300 mg/L เพื่อเพิ่มปริมาณแคลลัสให้มากขึ้น (ภาพที่ 23)

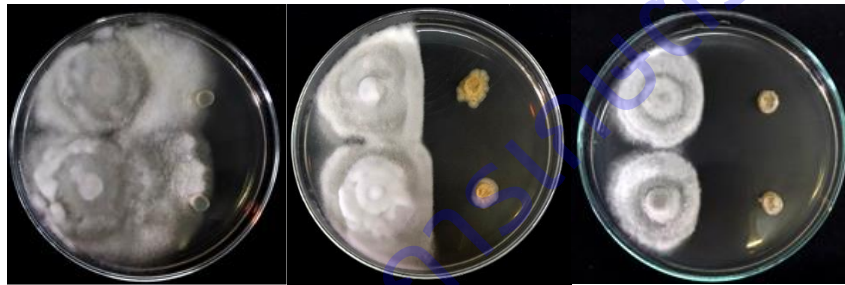
ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคใบอ้อยในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ

treatment	%Inhibition
control	0b
1	30.92a
2	38.93a
3	4.58b
4	1.29b
5	2.44b
6	0.51b
CV (%)	8.5

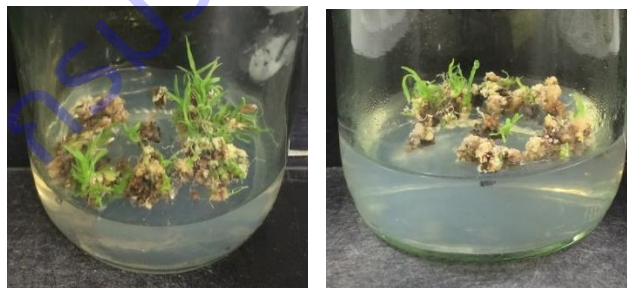
หมายเหตุ: a, b, c แสดงความแตกต่างในแนวตั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



ภาพที่ 21 เชื้อ *Streptomyces* A=เชื้อบนอาหาร AGMA B=เชื้อบนอาหาร AGMB



ภาพที่ 22 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* spp. ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคอ้อยในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 23 แสดงการชักนำให้เกิดต้นของ (1) อ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μ l (2) อ้อยที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μ l ในอาหารสูตร MSS1 อายุประมาณ 1 เดือน

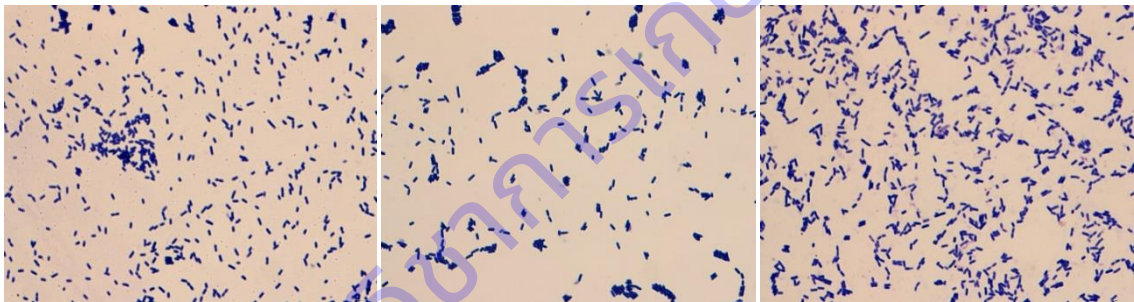
การทดสอบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้อ้อยที่ติดเชื้อใบขาว จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อยในแปลงปลูกอ้อยพื้นที่จังหวัดขอนแก่น นำตัวอย่างดินบริเวณรากที่เก็บมา แยกเชื้อแบคทีเรียโดยชั่งดินจำนวน 10 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายดินมาทำให้เจือจางด้วยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} จากนั้นนำสารละลายดิน 0.1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นที่ 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}

และ 10^8 มากระจายบนอาหารกึ่งจำเพาะ Tryptic soy agar ได้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 50 ไอโซเลท เพื่อนำไปจำแนกสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

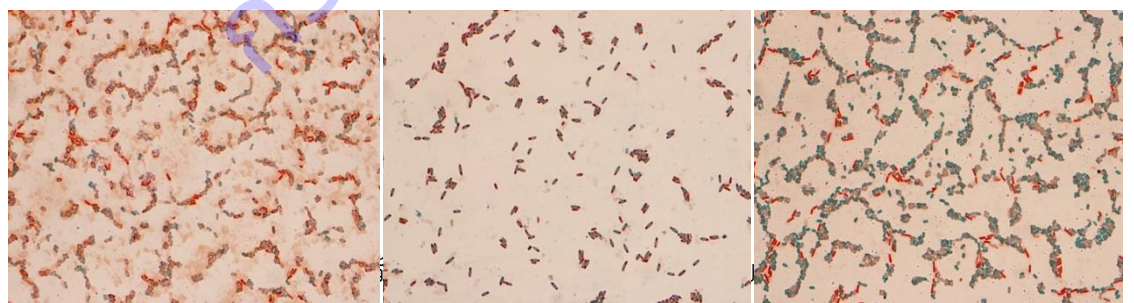
จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ สีขาวถึงสีครีม ผิวไม่มันวาว จากการทดสอบคุณสมบัติการติดสีแบบแกรมพบว่า เชื้อ *Bacillus* spp. ทั้ง 50 ไอโซเลท ติดสีแกรมบวก เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนตรง (rod shaped) สร้างเอ็นโดสปอร์บริเวณกลางเซลล์ (ภาพที่ 24)

ผลการทดสอบปริมาณสาร IAA ที่สร้างโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ครอบครัวย่อย จำนวน 50 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อจำนวน 30 ไอโซเลท (ภาพที่ 25) ที่สามารถสร้างสาร IAA ได้ ความเข้มข้นระหว่าง 1.5 – 57.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลทที่ 15 มีการสร้างสาร IAA มากที่สุด คือ 57.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นไอโซเลทที่ 10 และ 24 คือ 44.1 และ 24.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ IAA มาตรฐาน (ตารางที่ 4) โดยจะนำเชื้อที่สร้างสาร IAA สูงมาใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสารไนโตรเจน

ยีน *nifH* ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยคัดเลือกแบคทีเรียมาศึกษา ประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผลิตสาร IAA สามารถคัดเลือกเชื้อในบริเวณ *nifH* ได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลท ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ *nif95F* และ *nif97R* พบว่าชิ้นยีนเป้าหมายมีขนาด 500 bp



ภาพที่ 24 ลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. มีรูปร่างเป็นท่อนยาว (rod shapes) ติดสีแกรมบวก



ภาพที่ 25 ผลการทดสอบปริมาณสาร IAA ที่สร้างโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ครอบครัวย่อย

ตารางที่ 4 ปริมาณสาร IAA ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus* sp. รอบรากอ้อย

ไอโซเลต	ความเข้มข้นของ IAA (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
1	6.1
2	1.5
3	13.2
4	7.2
5	13.3
6	13.1
7	19
8	14.1
9	8.1
10	44.1
11	13.3
12	10.1
13	14.5
14	17.1
15	57.5
16	13.3
17	10.1
18	18.5
19	13.7
20	14.5
21	17.1
22	16.4
23	17.2
24	22.3
25	16.9

การศึกษาการจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดง โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการ ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรค มาแยกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการโดยวิธี Tissue transplanting แยกสปอร์เดี่ยวเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* สามารถจัดกลุ่มเบื้องต้นตามลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้จำนวน 6 กลุ่ม นำตัวแทนเชื้อทั้ง 6 กลุ่มมาเลี้ยงบนอาหารต่างชนิดกัน จากนั้นวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า โคลิโคนีของเชื้อรา *Colletotrichum falcatum* เจริญได้ดีบนอาหาร OMA MEA และ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

7.5 - 8.0 เซนติเมตร 6.8 - 7.2 เซนติเมตร และ 6.5 - 6.7 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคลนีสีขาว เทา และเทาเข้มถึงดำ สร้างกลุ่มสปอร์สีส้มจำนวนมาก โคลนีสบนอาหาร OMA สร้างสปอร์เซลล์เดี่ยว รูปร่างโค้ง (falcate) ขนาด 20-30 x 4-5 ไมโครเมตร สร้างแอฟเพรสซอเรีย ขนาด 9-13 x 11-12 ไมโครเมตร สร้าง seta ขนาด 100-300 x 4-9 ไมโครเมตร

สำหรับเชื้อรา *Fusarium* sp. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า โคลนีสของเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคลนีสีขาว อมชมพูถึงม่วง เชื้อสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน รูปร่าง macroconidia ยาวเรียวโค้งหรือเกือบตรง มี 3-5 septate หรืออาจมากกว่านั้น ขนาด 3.2-3.7 x 32.7- 43.5 ไมโครเมตร apical cell โค้งเล็กน้อย ปลายเรียว พบจำนวนน้อย microconidia เซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) หรือรูปไข่ (oval) ขนาด 2.3-2.6 x 5.9-7.3 ไมโครเมตร ถูกสร้างจำนวนมาก เกิดแบบกลุ่ม (false heads) หรือเรียงต่อกันเป็นโซ่ (chains) บน phialide บนปลายก้าน conidiophore พบน้อยที่เกิดจาก phialide ที่เจริญจากเส้นใยโดยตรง

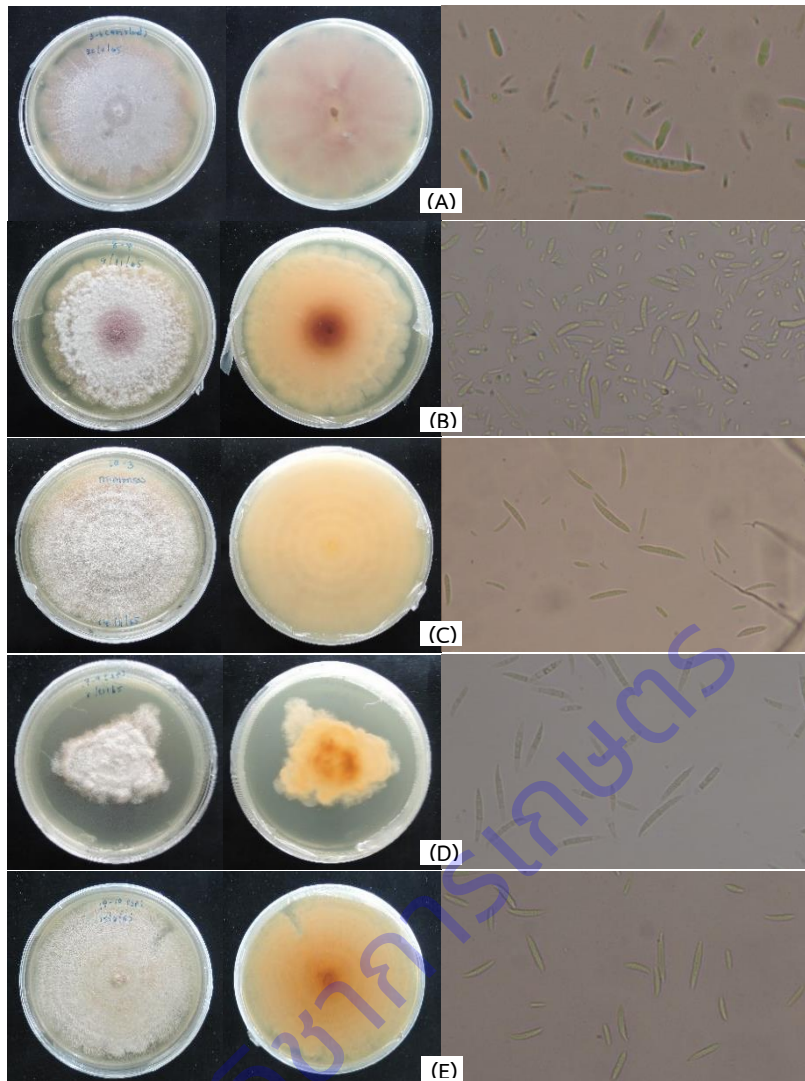
จากการจำแนกชนิดของเชื้อราในเบื้องต้นตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถแยกเชื้อรา *Fusarium* spp. ได้จำนวน 14 ไอโซเลท โดยจัดกลุ่มตามลักษณะที่ปรากฏออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 โคลนีสบนอาหาร PDA สีขาวอมชมพู เส้นใยฟูละเอียด สร้างรงควัตถุ (pigment) สีม่วงอ่อนในอาหาร microconidia เซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) macroconidia รูปร่างยาว โค้งเล็กน้อย มี 3-4 septate (ภาพที่ 26A)

กลุ่ม 2 โคลนีสบนอาหาร PDA มีสีขาวยอมชมพูถึงม่วงเข้ม สร้างรงควัตถุ (pigment) สีม่วงเข้มในอาหาร เส้นใยฟูหนาแน่น microconidia มี 1-2 เซลล์ รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) หรือรูปไข่ (oval) macroconidia รูปร่าง โค้งมี 3-4 septate (ภาพที่ 26B)

กลุ่ม 3 โคลนีสบนอาหาร PDA มีสีขาวยอมชมพู เส้นใยฟูละเอียดหนาแน่น microconidia รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) มี 1-2 เซลล์ macroconidia รูปร่างยาว โค้งเล็กน้อยมี 2-4 septate (ภาพที่ 26C)

กลุ่ม 4 โคลนีสบนอาหาร PDA มีสีขาวยิ่งส้ม เส้นใยฟูหนาแน่น สร้างรงควัตถุ (pigment) สีส้มถึงน้ำตาลในอาหาร microconidia มี 1-2 เซลล์ รูปร่างคล้ายกระสวย (spindle) พบ macroconidia จำนวนมาก รูปร่าง เรียว มี 3-5 septate (ภาพที่ 26D) กลุ่ม 5 โคลนีสบนอาหาร PDA เริ่มแรกมีสีขาวยิ่งส้มถึงน้ำตาลเมื่ออายุมากขึ้น เส้นใยฟูละเอียด microconidia มี 1-2 เซลล์ รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) macroconidia ค่อนข้างสั้น โค้งเล็กน้อยเกือบตรง มี 3-5 septate พบเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 26E)



ภาพที่ 26 กลุ่มของเชื้อรา *Fusarium* spp. ตามลักษณะปรากฏบนอาหาร PDA (A) กลุ่ม 1 (B) กลุ่ม 2 (C) กลุ่ม 3 (D) กลุ่ม 4 และ (E) กลุ่ม 5

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา *C. falcatum* และ *F. moniliforme* สาเหตุของโรคเหี่ยวเน่าแดงในอ้อยสำรวจพื้นที่ที่เคยพบการระบาดของโรคเหี่ยวเน่าแดงและเก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการเส้นกลางใบแดงเพื่อนำมาแยกเชื้อ ในพื้นที่ อ. อุ้มทอง 3 ครั้ง จำนวน 6 แปลง อ. สองพี่น้อง 4 ครั้ง จำนวน 9 แปลง และ อ.สามชุก 2 ครั้ง จำนวน 5 แปลง เพื่อนำมาทดสอบความรุนแรงของเชื้อ โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธี plug method ในอ้อยพันธุ์ LK92-11 (Resistance check) อุ้มทอง 8 อุ้มทอง 10 (Susceptible check) พันธุ์อ้อยเหี่ยว (พันธุ์ที่เคยพบการระบาดรุนแรงของโรคเหี่ยวเน่าแดงเมื่อปี 2534) และ พันธุ์ขอนแก่น 3 ผลการทดสอบปฏิกิริยาต่อโรคเหี่ยวเน่าแดง พบว่า เชื้อ *C. falcatum* ไอโซเลทอุ้มทองที่ทดสอบกับอ้อย 5 พันธุ์ มีปฏิกิริยา MR-MS ไอโซเลทสองพี่น้องมีปฏิกิริยา MR-MS ไอโซเลทสามชุกมีปฏิกิริยา R MR และ S เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของระดับความรุนแรงที่วัดจากการลามของเชื้อภายในลำของทุกพันธุ์ พบว่า ไอโซเลทสามชุกมีระดับความรุนแรงเฉลี่ยมากที่สุด 3.1 รองลงมาคือ ไอโซเลทสองพี่น้อง 2.8 และ ไอโซเลท อุ้มทอง 2.5 (ตารางที่ 5) สำหรับเชื้อ *F. moniliforme* พบว่า ไอโซเลทอุ้มทองมีปฏิกิริยา R ไอโซเลทสองพี่น้องมีปฏิกิริยา R-MR ไอโซเลทสามชุกมีปฏิกิริยา R MR และ S เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยของระดับความรุนแรงที่วัดจากการลามของเชื้อภายในลำของทุกพันธุ์ พบว่าไอโซเลทสามชุกมีระดับความรุนแรงมากที่สุด 1.6 รองลงมาคือ ไอโซเลทสองพี่น้อง 1.3 และ ไอโซเลท อุ้มทอง 1.0 (ตารางที่ 6)

จากผลการทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดง โยโซเลทสามชุกมีความรุนแรงมากที่สุดทั้ง *C. falcatum* และ *F. moniliforme* จึงเลือกโยโซเลทสามชุกสำหรับศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อราดังกล่าว และ จะใช้เชื้อโยโซเลทสามชุกสำหรับการทดสอบปฏิกริยาต่อโรคเหี่ยวเน่าแดงของศูนย์วิจัยพืชไร่นาสุพรรณบุรีต่อไป

ตารางที่ 5 ปฏิกริยาต่อเชื้อ *Colletotrichum falcatum* ในอ้อย 5 พันธุ์

ลำดับ	โคลน/พันธุ์	<i>Colletotrichum falcatum</i>					
		อู่ทอง		สองพี่น้อง		สามชุก	
		อาการลามของเชื้อในลำ	ปฏิกริยา	อาการลามของเชื้อในลำ	ปฏิกริยา	อาการลามของเชื้อในลำ	ปฏิกริยา
1	E-Heaw	2.2	MR	2.0	MR	1.0	R
2	UT8	2.3	MR	3.1	MS	3.7	S
3	UT10	2.8	MS	2.9	MS	3.5	S
4	LK92-11	2.3	MR	2.5	MS	3.5	S
5	KK3	2.4	MR	2.5	MS	1.8	MR
เฉลี่ย		2.5		2.8		3.1	

หมายเหตุ: R = ต้านทาน (Resistant)
 MR = ต้านทานปานกลาง (Moderately Resistant)
 MS = อ่อนแอปานกลาง (Moderately susceptible)
 S = อ่อนแอ (susceptible)
 HS = อ่อนแอมาก (Highly susceptible)

ตารางที่ 6 ปฏิกริยาต่อเชื้อ *Fusarium moniliforme* ในอ้อย 5 พันธุ์

ลำดับ	โคลน/พันธุ์	<i>Fusarium moniliforme</i>					
		อู่ทอง		สองพี่น้อง		สามชุก	
		อาการลามของเชื้อในลำ	ปฏิกริยา	อาการลามของเชื้อในลำ	ปฏิกริยา	อาการลามของเชื้อในลำ	ปฏิกริยา
1	E-Heaw	1.0	R	1.0	R	1.0	R
2	UT8	1.0	R	1.1	R	1.3	R
3	UT10	1.1	R	1.7	MR	2.6	MS
4	LK92-11	1.0	R	1.2	R	1.6	MR
5	KK3	1.0	R	1.3	R	1.3	R
เฉลี่ย		1.0		1.3		1.6	

หมายเหตุ: R = ต้านทาน (Resistant)
 MR = ต้านทานปานกลาง (Moderately Resistant)
 MS = อ่อนแอปานกลาง (Moderately susceptible)
 S = อ่อนแอ (susceptible)
 HS = อ่อนแอมาก (Highly susceptible)

การประเมินความรุนแรงของเชื้อโรคเหี่ยวเน่าแดงในสภาพโรงเรือน ได้ดำเนินการเก็บเชื้อสาเหตุโรค และ จัดทำแปลงพันธุ์อ้อยเพื่อใช้ในการทดลอง โดยได้ปลูกอ้อย เมื่อวันที่ 17 มกราคม 2565 จำนวน 13 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ KK3 LK92-11 K84-200 K95-84 K88-92 E-Heaw UT1 UT5 UT8 UT10 UT12 UT3 และ UT15 เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน ตัดอ้อยเพื่อนำไปประเมินความรุนแรงของโรค (ตัดแปลงวิธีการของ อัปสรและคณะ, 2535) สำหรับการประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *C. falcatum* พบว่าพันธุ์ UT3 เกิดโรครุนแรงที่สุด โดย

วัดความยาวแผลได้มากที่สุด คือ 30.53 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างจากพันธุ์ K95-84 UT10 UT5 และ UT15 ที่มี ความยาวแผล 25.60 25.57 23.03 และ 22.63 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับพันธุ์ที่เกิดโรคน้อย ได้แก่ พันธุ์ E-Heaw KK3 และ K84-200 ซึ่งมีความยาวแผล 12.43 12.90 และ 13.40 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

การประเมินความรุนแรงของโรคที่เกิดจากเชื้อรา *F. moniliforme* พบว่าพันธุ์ UT3 เกิดโรครุนแรงที่สุด เช่นเดียวกับการทดสอบในเชื้อรา *C. falcatum* โดยวัดความยาวแผลได้มากที่สุด คือ 23.87 เซนติเมตร แต่ไม่แตกต่างจากพันธุ์ K95-84 K88-92 ที่มีความยาวแผล 18.07 และ 21.93 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับพันธุ์ที่เกิด โรคน้อย ได้แก่ พันธุ์ UT12 ที่มีความยาวแผล 9.47 เซนติเมตร (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 การประเมินความรุนแรงของเชื้อรา *C. falcatum* ต่ออ้อยพันธุ์การค้า จำนวน 13 พันธุ์

พันธุ์อ้อย	อาการลามของเชื้อในลำอ้อย
UT3	30.53 a
K95-84	25.60 ab
UT10	25.57 ab
UT5	23.03 abc
UT15	22.63 abc
UT8	21.80 bc
K88-92	19.07 bcd
UT1	16.57 cd
UT12	16.57 cd
LK92-11	15.13 cd
K84-200	13.40 d
KK3	12.90 d
E-Heaw	12.43 D
CV(%)	24.9

ตารางที่ 8 การประเมินความรุนแรงของเชื้อรา *F. moniliforme* ต่ออ้อยพันธุ์การค้า จำนวน 13 พันธุ์

พันธุ์อ้อย	อาการลามของเชื้อในลำอ้อย
UT3	23.87 a
K95-84	21.93 ab
K88-92	18.07 abc
K84-200	16.47 bc
E-Heaw	14.85 cd
UT10	14.74 cd
UT5	14.20 cd
UT15	13.43 cd
UT1	13.13 cd
KK3	12.80 cd
UT8	12.37 cd
LK92-11	11.60 cd
UT12	9.47 d
CV(%)	26.7

การใช้สารชีวภัณฑ์ในการป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาวอ้อยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ดำเนินการทดลองในแปลงเกษตรกร อ.เมือง จ.นครสวรรค์ ระหว่าง เดือนตุลาคม 2564 ถึง เดือนกันยายน 2565 โดยโรยเชื้อราเขียว ฟันไส้เดือนฝอย เปรียบเทียบกับการไม่ใช้เชื้อราเขียว และ ไส้เดือนฝอย หลังจากอ้อย อายุ 45 วัน ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อย ตั้งแต่อ้อยอายุ 2 เดือน ตรวจสอบทุกเดือน ๆ ละ 1 ครั้ง จำนวน 5 ครั้ง พบว่า เปอร์เซ็นต์ความงอกของอ้อยในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีความงอก เฉลี่ย ระหว่าง 54.67-59.67% (ตารางที่ 9) เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อยในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่การโรยเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ DOA-M14 อัตรา 10 กก./ไร่ บนท่อนพันธุ์อ้อย และการพ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* อัตรา 75 กรัม/น้ำ 20 ลิตร บนท่อนพันธุ์อ้อย มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาวอ้อย โดยไม่พบการเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อย (ตารางที่ 10) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี (ไม่ระบุปีที่พิมพ์) ที่พบว่า เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ DOA-M14 เป็นสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับด้วงหนวดยาวอ้อย สามารถใช้ในการควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อยได้ในห้องปฏิบัติการและสภาพไร่ นอกจากนี้มีการนำไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ไปใช้ในการควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อยในสภาพไร่ การไม่พ่น หรือ โรยสารชีวภัณฑ์หรือสารฆ่าแมลงบนท่อนพันธุ์อ้อย พบด้วงหนวดยาวอ้อยเข้าทำลายอ้อย 0.06% (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อย ในไร่เกษตรกร อ.เมือง จ.นครสวรรค์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2564 ถึงเดือนกันยายน 2565

กรรมวิธี	ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อย (%)
1. โรยเชื้อราเขียว <i>Metarhizium anisopliae</i> สายพันธุ์ DOA-M6	58.33
2. โรยเชื้อราเขียว <i>Metarhizium anisopliae</i> สายพันธุ์ DOA-M14	56.67
3. โรยเชื้อราเขียว <i>Metarhizium anisopliae</i> สายพันธุ์ DOA-M32	59.00
4. พ่นไส้เดือนฝอย <i>Steinernema carpocapsae</i>	57.33
5. พ่นไส้เดือนฝอย สายพันธุ์ไทย	54.67
6. พ่นสารฆ่าแมลง พิโพรนิล 5% SC	58.67
7. โรยสารฆ่าแมลง พิโพรนิล 0.3% G	59.67
8. ไม่พ่น/โรยชีวภัณฑ์หรือสารฆ่าแมลง	57.33
CV (%)	7.4

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อย ในไร่เกษตรกร อ.เมือง จ.นครสวรรค์ ระหว่าง
เดือนตุลาคม 2564 ถึง เดือนกันยายน 2565

กรรมวิธี	การเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อย (%)					
	อายุของอ้อย (เดือน)					
	2	3	4	5	6	เฉลี่ย
1. โรยเชื้อราเขียว <i>Metarhizium anisopliae</i> สายพันธุ์ DOA-M6	0.24	0.22	0.17	0	0	0.13
2. โรยเชื้อราเขียว <i>Metarhizium anisopliae</i> สายพันธุ์ DOA-M14	0	0	0	0	0	0
3. โรยเชื้อราเขียว <i>Metarhizium anisopliae</i> สายพันธุ์ DOA-M32	0.19	0.17	0	0	0	0.07
4. ฟันไส้เดือนฝอย <i>Steinernema</i> <i>carpocapsae</i>	0.23	0	0	0	0	0.05
5. ฟันไส้เดือนฝอย สายพันธุ์ไทย	0	0	0	0	0	0
6. ฟันสารฆ่าแมลง พิโพรินิล 5% SC	0	0	0	0	0	0
7. โรยสารฆ่าแมลง พิโพรินิล 0.3% G	0	0.15	0	0	0	0.03
8. ไม่ฟัน/โรยชีวภัณฑ์หรือสารฆ่าแมลง	0	0.2	0.12	0	0	0.06

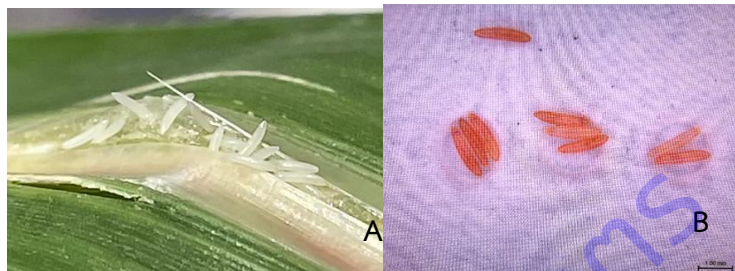
การศึกษาประชากรจักจั่นอ้อยและปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดในพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญ ผลการศึกษาประชากรของจักจั่นอ้อยและปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดในพื้นที่ปลูกอ้อยของเกษตรกร 5 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และกาญจนบุรี ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนตุลาคม 2565 ดังนี้ แปลงอ้อยเกษตรกรในพื้นที่ อ.ศรีประจันต์ และอ.สามชุก จ.สุพรรณบุรี ไม่พบจักจั่นอ้อยทั้ง 4 แปลง มีอุณหภูมิดินและอากาศอยู่ในช่วง 27.5-36.0°C และ 28.9-40.1°C ตามลำดับ ความชื้นสัมพัทธ์ในดินและอากาศอยู่ในช่วง 33.9-87.7 % และ 30.2-73.3 % และมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.3-7.0 แปลงอ้อยเกษตรกรในพื้นที่ อ.แสวงหา จ.อ่างทอง พบจักจั่นอ้อยเพียง 2 แปลง โดยพบจักจั่นในระยะตัวเต็มวัยในเดือนเมษายน มีอุณหภูมิดินและอากาศอยู่ในช่วง 25.0-37.5°C และ 26.4-42.7°C ตามลำดับ ความชื้นสัมพัทธ์ในดินและอากาศอยู่ในช่วง 53.7-89.3 % และ 34.5-69.5 % และมีค่า pH อยู่ในช่วง 6.2-7.1 แปลงอ้อยเกษตรกรในพื้นที่ อ.ค่ายบางระจัน จ.สิงห์บุรี พบจักจั่นอ้อยจำนวน 2 แปลง โดยพบระยะไข่และตัวเต็มวัยในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม และระยะตัวอ่อนในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม มีอุณหภูมิดินและอากาศอยู่ในช่วง 28.0-36.4°C และ 31.9-41.2°C ตามลำดับ ความชื้นสัมพัทธ์ในดินและอากาศอยู่ในช่วง 56.3-89.3 % และ 34.1-67.9 % และมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.8-7.0 แปลงอ้อยเกษตรกรในพื้นที่ อ.สรรคบุรี จ.ชัยนาท ไม่พบจักจั่นอ้อยทั้ง 4 แปลง มีอุณหภูมิดินและอากาศอยู่ในช่วง 26.7-36.9°C และ 28.9-40.4°C ตามลำดับ ความชื้นสัมพัทธ์ในดินและอากาศอยู่ในช่วง 68.3-88.7 % และ 32.6-96.4 % และมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.6-8.3 แปลงอ้อยเกษตรกรในพื้นที่ อ.ท่าม่วง และอ.ด่านมะขามเตี้ย จ.กาญจนบุรี พบจักจั่นอ้อยจำนวน 1 แปลง

ในพื้นที่ อ.ท่าม่วง ในเดือนพฤษภาคม มีอุณหภูมิดินและอากาศอยู่ในช่วง 26.0-37.5°C และ 27.9-42.3°C ตามลำดับ ความชื้นสัมพัทธ์ในดินและอากาศอยู่ในช่วง 58.7-86.3 % และ 30.8-88.3 % และมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.5-7.4 (ตารางที่ 35-38) จากการสำรวจแปลงย่อยทุกแปลงทั้ง 5 จังหวัด ไม่พบศัตรูธรรมชาติของจักจั่นอ้อยเก็บ ตัวอย่างดินแปลงย่อย 5 จังหวัดรวม 20 แปลงเพื่อทำการวิเคราะห์ พบว่า ดินจังหวัดกาญจนบุรี มีค่า pH กลางถึงต่ำเล็กน้อยคือมีค่า 6.8-8.2 ค่า EC 0.07-0.19 dS/m เป็นดินที่ไม่มี ความเค็ม ค่าอินทรีย์วัตถุ 0.83-2.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ดินมีอินทรีย์วัตถุปานกลาง ยกเว้นแปลงที่ 3 ที่มีอินทรีย์วัตถุค่อนข้างต่ำ ค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 26-54 ppm ส่วนใหญ่มีค่าปานกลางยกเว้นแปลงที่ 1 ที่มีฟอสฟอรัสสูง ค่าโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 29-100 ppm แปลงที่ 3 และ 4 มีโพแทสเซียมต่ำกว่าแปลงอื่น ๆ คือ 66 และ 29 ppm ตามลำดับ ดินจังหวัด ชัยนาท มีค่า pH เป็นกรดเล็กน้อยคือมีค่า 6.2-6.7 ค่า EC 0.07-0.12 dS/m เป็นดินที่ไม่มี ความเค็ม ค่าอินทรีย์วัตถุ 1.07-2.38 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ดินมีอินทรีย์วัตถุปานกลาง ยกเว้นแปลงที่ 4 ที่มีอินทรีย์วัตถุค่อนข้างต่ำ คือ 1.07 เปอร์เซ็นต์ ค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 17-55 ppm แปลงที่ 3 และ 4 มีฟอสฟอรัสต่ำ คือ 17 ppm ค่า โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 59-133 ppm ส่วนใหญ่มีค่าโพแทสเซียมปานกลางและสูง ยกเว้นแปลงที่ 2 มีค่าต่ำ คือ 59 ppm ดินจังหวัดสิงห์บุรี มีค่า pH เป็นกรดเล็กน้อยถึงต่ำเล็กน้อยคือมีค่า 6.3-7.5 ค่า EC 0.06-0.17 dS/m เป็นดินที่ไม่มี ความเค็ม ค่าอินทรีย์วัตถุ 1.31-1.76 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ดินมีอินทรีย์วัตถุต่ำ ยกเว้นแปลงที่ 4 ที่มีอินทรีย์วัตถุปานกลางคือ 1.76 เปอร์เซ็นต์ มีค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูง 62-474 ppm ค่าโพแทสเซียมที่ แลกเปลี่ยนได้ 36-62 ppm ซึ่งทุกแปลงมีโพแทสเซียมที่ค่อนข้างต่ำถึงต่ำมาก ดินจังหวัดสุพรรณบุรี มีค่า pH เป็น กรดเล็กน้อยถึงต่ำเล็กน้อยคือมีค่า 6.3-7.7 ค่า EC 0.08-0.31 dS/m เป็นดินที่ไม่มี ความเค็ม ค่าอินทรีย์วัตถุ 1.57-2.43 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่ดินมีอินทรีย์วัตถุปานกลาง ยกเว้นแปลงที่ 2 ที่มีอินทรีย์วัตถุค่อนข้างต่ำคือ 1.57 เปอร์เซ็นต์ ค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 19-44 ppm มีฟอสฟอรัสปานกลางถึงสูงในบางแปลง ค่าโพแทสเซียมที่ แลกเปลี่ยนได้ 68-86 ppm ส่วนใหญ่มีโพแทสเซียมปานกลาง ยกเว้นแปลงที่ 4 มีค่าต่ำคือ 68 ppm ดินจังหวัด อ่างทอง มีค่า pH เป็นกรดเล็กน้อยถึงต่ำเล็กน้อยคือมีค่า 6.2-7.5 ค่า EC 0.08-0.24 dS/m เป็นดินที่ไม่มี ความ เค็ม ค่าอินทรีย์วัตถุมีปานกลาง 1.82-2.29 เปอร์เซ็นต์ ค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ 18-42 ppm ส่วนใหญ่มี ฟอสฟอรัสปานกลาง ยกเว้นแปลงที่ 1 มีฟอสฟอรัสที่สูง คือ 42 ppm ค่าโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ 50-113 ppm ส่วนใหญ่มีโพแทสเซียมที่สูง ยกเว้นแปลงที่ 2 มีค่าต่ำคือ 50 ppm

การศึกษาชีววิทยาของจักจั่นอ้อยในสภาพห้องปฏิบัติการ จากการศึกษาชีววิทยาของจักจั่นอ้อย พบว่า ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม บริเวณภายในเนื้อเยื่อเส้นกลางใบอ้อย (ภาพที่ 27) ไข่มีลักษณะยาวรี เมื่อวางใหม่ มีสีขาวขุ่น (ภาพที่ 28A) เริ่มใสและมีจุดสีแดง 2 จุด เมื่อใกล้ฟัก (ภาพที่ 28B) ระยะตัวอ่อนอาศัยอยู่ในดินบริเวณ รอบและใต้รากอ้อย โดยขุดดินเป็นรูยาวอาศัยภายในรู (ภาพที่ 29A) เมื่อใกล้ฟักเป็นตัวเต็มวัยจะเคลื่อนย้ายจากรู ใต้ดินขึ้นมาบริเวณผิวดินเพื่อลอกคราบ (ภาพที่ 29B และ 29C) ลักษณะของตัวอ่อน ส่วนหัว หนวด ออก ท้อง และ ขา เมื่อฟักใหม่มีลักษณะสีแดงใส (ภาพที่ 30A) หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น (ภาพที่ 30B) เมื่อใกล้ลอกคราบ เป็นตัวเต็มวัยตาจะมีสีแดง (ภาพที่ 30C) ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่บริเวณใบและยอดอ้อย ลักษณะของตัวเต็มวัย ส่วนหัว สีดำ ตาสีแดง หนวดสีน้ำตาล ออกสีน้ำตาลสลับแถบเหลือง ปีกสีน้ำตาลเหลือง และขาน้ำตาล (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 27 ลักษณะรอยตัวเต็มวัยของจักจั่นอ้อยวางไข่ในเส้นกลางใบอ้อย



ภาพที่ 28 ระยะไข่ของจักจั่นอ้อย A) ไข่ของจักจั่นอ้อยที่วางใหม่ B) ไข่จักจั่นเมื่อใกล้ฟัก

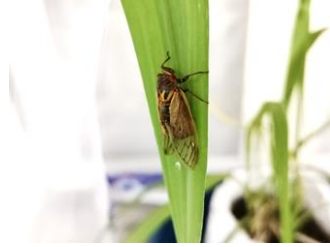


ภาพที่ 29 ลักษณะรูที่ตัวอ่อนจักจั่นอ้อยอาศัยและคราบของตัวอ่อน A) ลักษณะรูที่ตัวอ่อนอาศัยอยู่ภายใน B) คราบของจักจั่นอ้อยที่อยู่บนผิวดิน C) คราบของจักจั่นอ้อยที่เกาะอยู่บนใบหญ้า



ภาพที่ 30 ระยะตัวอ่อนของจักจั่นอ้อย

A) ตัวอ่อนของจักจั่นอ้อยที่ฟักใหม่ B) ตัวอ่อน C) ตัวอ่อนระยะสุดท้ายเมื่อใกล้ลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย



ภาพที่ 31 ตัวเต็มวัยของจ๊กจั่นอ้อย

การประเมินความเสียหายของอ้อยจากการเข้าทำลายของจ๊กจั่นอ้อย แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้ เก็บรวบรวมจ๊กจั่นอ้อยในพื้นที่ระบาดของจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และกาญจนบุรี (ภาพที่ 32) ปลูกอ้อยในถุงเพาะปลูกเพื่อเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจ๊กจั่นอ้อยสำหรับการทดลอง (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 32 การเก็บรวบรวมจ๊กจั่นอ้อยในแปลงอ้อย

A) เก็บรวบรวมจ๊กจั่นอ้อยในแปลงอ้อย B) เก็บรวบรวมตัวอ่อน C) เก็บรวบรวมไข่จ๊กจั่น



ภาพที่ 33 ปลูกอ้อยและเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจ๊กจั่นอ้อย

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน

การสำรวจและศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ganoderma* spp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน จากการสำรวจโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน พบลักษณะอาการทางใบพับลู่ลงคล้ายอาการขาดน้ำ ยอดไม้คลี และเกิดดอกเห็ดบริเวณรอบโคนต้นปาล์มน้ำมัน ส่งผลให้ผลผลิตลดลง อีกทั้งมักเกิดการโคนล้ม เนื่องจากภายในลำต้นของปาล์มน้ำมันโดนทำลายจากเส้นใยของเชื้อราทำให้เกิดการผุ เปื่อย (ภาพที่ 34) และเมื่อเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ganoderma* spp. ในพื้นที่ระบาด 6 จังหวัด สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างได้ 41 ไอโซเลท ได้แก่ จังหวัดกระบี่ 21 ไอโซเลท คือ KBI01 KBI02 KBI03 KBI04 KBI05 KBI06 KBI07 KBI08 KBI09 KBI10 KBI11 KBI12 KBI13 KBI14 KBI15 KBI16 KBI17 KBI18 KBI19 KBI20 และ KBI21 จังหวัดตรัง 2 ไอโซเลท คือ TRG01 และ TRG02 จังหวัด

นครศรีธรรมราช 6 ไอโซเลท คือ NRT01 NRT02 NRT03 NRT04 NRT05 และ NRT06 จังหวัดสุราษฎร์ธานี 10 ไอโซเลท คือ SNI01 SNI02 SNI03 SNI04 SNI05 SNI06 SNI07 SNI08 SNI09 และ SNI10 จังหวัดชุมพร 1 ไอโซเลท คือ CPN01 และจังหวัดปทุมธานี 1 ไอโซเลท คือ PTI01 (ตารางที่ 11) โดยสามารถพบการเกิดเชื้อรา *Ganoderma* spp. ได้ทั้งในปาล์มน้ำมันรอบที่ 1 อายุในช่วง 10-30 ปี แปลงปาล์มน้ำมันที่เคยเป็นแปลงมะพร้าว เช่น NRT06 ตำบลเกาะหวด อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช และแปลงส้มเก่า ได้แก่ PTI01 ตำบลบึงชำ อ้อ อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จากการสำรวจยังพบว่าแปลงปาล์มน้ำมันที่ปล่อยต้นรอบที่ 1 ยืนต้นตาย ภายในแปลงเป็นแหล่งสะสมเชื้อ (source inoculum) สอดคล้องกับ Turner (1981) ซึ่งพบว่าการระบาดของเชื้อรา *Ganoderma* spp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันสามารถติดต่อได้จากการสัมผัสของรากระหว่างต้นที่เป็นโรคและต้นปกติ อีกทั้งยังสามารถแพร่กระจายโดยเชื้อที่ติดไปกับเศษซากที่อยู่ภายในแปลง ส่งผลให้มีการระบาดเพิ่มขึ้น โดยส่วนใหญ่พบเชื้อรา *Ganoderma* spp. เข้าทำลายอยู่ ซึ่งอาจระบาดไปสู่ต้นปาล์มน้ำมันในรอบที่ 2 ได้ ซึ่งอัตราการเข้าทำลายปาล์มน้ำมันรอบที่ 2 มีอัตราเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลูกในแปลงที่มีตอกเก่าเป็นแหล่งสะสมเชื้อ (Hasan & Turner, 1998; Flood *et al.*, 2000; Virdiana *et al.*, 2012) (ภาพที่ 35)

เก็บข้อมูลลักษณะดอกเห็ดที่ได้จากการสำรวจ เมื่อจัดกลุ่มลักษณะดอกเห็ดของเชื้อรา *Ganoderma* spp. ด้วยรูปร่างพบว่าเชื้อรา *Ganoderma* spp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยา (ภาพที่ 36) โดยสามารถแบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ คือ รูปร่างใบพัดมีก้านดอก 11 ไอโซเลท ได้แก่ KBI01 KBI03 KBI16 KBI18 KBI19 KBI20 NRT01 SNI01 SNI03 SNI10 และ PTI01 (ภาพที่ 37) รูปร่างใบพัดไม่มีก้านดอก 15 ไอโซเลท ได้แก่ KBI02 KBI04 KBI05 KBI06 KBI08 KBI09 KBI10 KBI11 KBI13 TRG02 NRT02 NRT04 NRT06 SNI05 และ CPN01 (ภาพที่ 38) ก้อนกลมมีก้านดอก 5 ไอโซเลท ได้แก่ NRT03 SNI02 SNI04 SNI08 และ SNI09 (ภาพที่ 39) และก้อนกลมไม่มีก้านดอก 10 ไอโซเลท ได้แก่ KBI07 KBI12 KBI14 KBI15 KBI17 KBI21 TRG01 NRT05 SNI06 และ SNI07 (ภาพที่ 40) โดยพบสีของดอกเห็ดตั้งแต่สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม พบทั้งมีและไม่มีขอบสีขาวขึ้นอยู่กับความอ่อนแก่ของดอก

การแยกเชื้อรา *Ganoderma* spp. จากดอกเห็ด เชื้อรา *Ganoderma* spp. บนอาหาร PDA พบลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ด้านหลังโคโลนีพบการเจริญของเส้นใยฝังลงในอาหาร PDA จนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดรอยแตกได้อย่างชัดเจน โดยโคโลนีมีอัตราการเจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 9 ซม. เฉลี่ย 10 วัน และเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการสร้าง Clamp connection สอดคล้องกับ Bharudin *et al.* (2022) ศึกษาความหลากหลายโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Ganoderma boninense* สาเหตุโรค ลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน พบว่าจากการแยกเชื้อราและเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ 7 วัน เชื้อรา *G. boninense* เกิดโคโลนีมีเส้นใยสีขาวจนถึงน้ำตาลลักษณะฝังลึกลงในอาหาร PDA (ภาพที่ 41) และเมื่อตรวจสอบลักษณะเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการสร้าง Clamp connection (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 34 ลำต้นโคนล้มเนื่องจากเส้นใยของเชื้อรา *Ganoderma* spp. เข้าทำลายอยู่ภายใน



ภาพที่ 35 เศษซากปาล์มน้ำมันเป็นแหล่งสะสมเชื้อ



ภาพที่ 36 ลักษณะความหลากหลายของดอกเห็ดเชื้อรา *Ganoderma* spp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน



ภาพที่ 37 ลักษณะดอกเห็ดกลุ่มที่ 1 รูปร่างใบพัดมีก้านดอก



ภาพที่ 38 ลักษณะดอกเห็ดกลุ่มที่ 2 รูปร่างใบพัดไม่มีก้านดอก



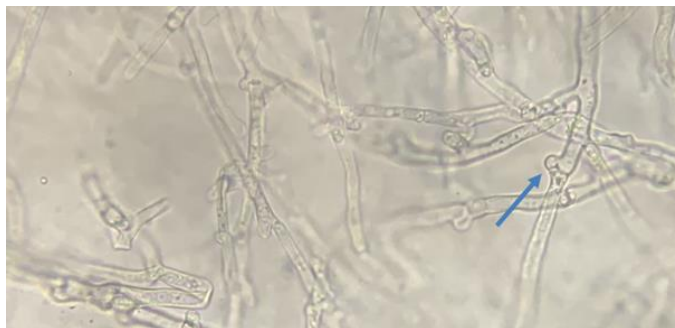
ภาพที่ 39 ลักษณะดอกเห็ดกลุ่มที่ 3 รูปร่างก้อนกลมมีก้านดอก



ภาพที่ 40 รูปร่างก้อนกลมไม่มีก้านดอก



ภาพที่ 41 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Ganoderma* spp.



ภาพที่ 42 Clamp connection บนเส้นใยเชื้อรา *Ganoderma* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อ *Ganoderma* sp. และอายุของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการปลูกเชื้อ *Ganoderma* sp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน การเตรียมก้อนเชื้อ ในการทดลอง ผลปรากฏว่าก้อนเชื้อขนาด 3.3 ตารางเซนติเมตร ใช้เวลา 6 วันเชื้อจึงเต็มขึ้นไม่ตายพารา ก้อนเชื้อขนาด 27 ตารางเซนติเมตร ใช้เวลา 9 วันเชื้อจึงเต็มขึ้นไม่ตายพารา ก้อนเชื้อขนาด 90 ตารางเซนติเมตร ใช้เวลา 12 วันเชื้อจึงเต็มขึ้นไม่ตายพารา ก้อนเชื้อขนาด 216 ตารางเซนติเมตร ใช้เวลา 15 วันเชื้อจึงเต็มขึ้นไม่ตายพารา ส่วนขี้เลื่อยไม่ตายพารา 50 กรัมใช้เวลา 7 วันเชื้อจึงเต็มก้อนเชื้อ (ตารางที่ 11) และอยู่ระหว่างเตรียมเมล็ดงอกเพื่อใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 11 เวลาในการเจริญของเชื้อ *Ganoderma* sp. จนเต็มขึ้นไม่ตายพารา สารละลายเส้นใย และขี้เลื่อยไม่ตายพารา

วิธีการ	เวลา(วัน)
1. ก้อนเชื้อขนาด $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ (3.3 ตร.ซม ²)	6
2. ก้อนเชื้อขนาด $3.0 \times 3.0 \times 3.0$ (27 ตร.ซม ²)	9
3. ก้อนเชื้อขนาด $6.0 \times 6.0 \times 2.5$ (90 ตร.ซม ²)	12
4. ก้อนเชื้อขนาด $6.0 \times 6.0 \times 6.0$ (216 ตร.ซม ²)	15
5. สารละลายเส้นใยของเชื้อ <i>Ganoderma</i> sp.	1
6. ขี้เลื่อยไม่ตายพารา 50 กรัม	7

ศึกษาวิธีการป้องกันโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Ganoderma* sp. ของปาล์มน้ำมันในการปลูกปาล์มรอบใหม่ แปลงที่ใช้ในการทดลองคือ แปลงนายปัญญา ด้วงคง ที่ตั้งแปลง ม.9 ต.ไทรซิง อ.พระแสง จ.สุราษฎร์ธานี 84210 ปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนตามขนาดหลุม 5 ขนาด คือ ตอต้นปกติชุดหลุมปลูกขนาด $0.45 \times 0.45 \times 0.35$ เมตร ต้นที่เป็นโรคชุดหลุมปลูก $0.45 \times 0.45 \times 0.35$ เมตร $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เมตร $1.0 \times 1.0 \times 1.0$ เมตร $1.5 \times 1.5 \times 1.5$ เมตร และ $2.0 \times 2.0 \times 2.0$ เมตร และอยู่ระหว่างการสังเกตอาการของต้นกล้าเพื่อเก็บข้อมูลต่อไป

การประเมินลักษณะหนานโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานีโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันทั้ง 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มหนานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน กลุ่มหนานปานกลางต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน และกลุ่มอ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน

เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอพบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณอยู่ในช่วง 214 - 395 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มีค่าอัตราส่วนของการดูดกลืนแสงที่ A260/A280 ใกล้เคียง 1.8 - 2.0 ซึ่งเป็นค่าความบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ให้การยอมรับ โดยสามารถบ่งบอกว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ สามารถแยกสารปนเปื้อนอื่น ๆ ออกจากสารละลายดีเอ็นเอได้ดี นอกจากนี้ เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพโดยการทำ PCR ทดสอบโดยใช้ยีน Actin เป็นยีนควบคุมด้วยคูไพรเมอร์ EgACT-Actin_F และ EgACT-Actin_R ตรวจผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า สามารถพบแถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน ได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 300 bp และไดแถบดีเอ็นเอชัดเจน ดังนั้นตัวอย่างทดลองนี้สามารถที่จะนำไปใช้ในการศึกษาชนิดซึ่งต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีต่อไปได้ การเพิ่มปริมาณยีนทนทานต่อโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันด้วยวิธี PCR ตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันด้วยคูไพรเมอร์จากยีนต่าง ๆ ตรวจผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า สามารถพบแถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์ และไดแถบดีเอ็นเอชัดเจน

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของปาล์มน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์ กับยีนในฐานข้อมูล EgCAPX-1 EgCHI2 EgEMLP1-1 EgMT-1 EgSPI-1 EgSBI1 EgDFS EgPRP EgT2RIP EgDHN EgGRRBP และ EgIFR พบว่า มี 2 ยีนคือ EgIFR และ EgMT-1 ที่ให้ความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันได้

การวิเคราะห์ชนิดปฏิกิริยาการหาลำดับเบส (DNA Sequencing) การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน isoflavone reductase กับปาล์มน้ำมันที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Ganoderma boninense* โดยการใช้ไพรเมอร์ EgIFR_F และ EgIFR_R พบว่า ตำแหน่งที่เกิดสลับจำนวน 36 ตำแหน่ง สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าออกจากกันได้ คือ สลับตำแหน่งที่ T178C G218T G219C T419G C429G T433G T434C G450T T452G C458A A460G T466G C472A C489A T492G G498T C507T T511G C696A C712T A714C C715T A717C G721T A723C G725A A726C T728A T826C A792G A1105T G1142A A1219G C1242T C1249T และ C1250T โดยลำดับเบสที่พบแตกต่างกันในปาล์มน้ำมัน 2 กลุ่ม มีจีโนไทป์แบบ heterozygous คือ TC GT GC TG CG GT CA AG CT AC GA TA AT ที่มีความถี่เท่ากับ 0.45 และมีจีโนไทป์แบบ homozygous คือ A/A C/C G/G และ T/T ที่มีความถี่เท่ากับ 0.55

การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบสลับของยีน metallothionein-like protein หรือ EgMT กับปาล์มน้ำมันที่ผ่านการปลูกเชื้อรา *Ganoderma boninense* โดยการใช้ไพรเมอร์ EgMT-1_F และ EgMT-1_R พบว่า ตำแหน่งที่เกิดสลับจำนวน 2 ตำแหน่ง สามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันกลุ่มที่ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าออกจากกันได้ คือ สลับตำแหน่งที่ G557A และ G583A โดยลำดับเบสที่พบแตกต่างกันในปาล์มน้ำมัน 2 กลุ่ม มีจีโนไทป์แบบ heterozygous คือ GA ที่มีความถี่เท่ากับ 0.27 และมีจีโนไทป์แบบ homozygous คือ G/G ที่มีความถี่เท่ากับ 0.73

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน การสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบคุณภาพ ผลการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอจากทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้น 105.88 - 232.64 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีปริมาณ 3.17 - 6.97 ไมโครลิตร อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/280 บอกลถึงความบริสุทธิ์อาร์เอ็นเออยู่ระหว่าง 2.07-2.14 ซึ่งค่าที่ได้มีค่าใกล้เคียง 2 หมายความว่า อาร์

เอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูง และอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ A260/230 อยู่ระหว่าง 1.24-1.63 ซึ่งน้อยกว่า 1.8 แสดงว่าอาร์เอ็นเอมีคุณภาพดีไม่มีการปนเปื้อนสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ (ภาพที่ 43)

การค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีนด้วยการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์ (transcriptomics) การหาจำนวน reads บนจีโนมของปาล์มน้ำมันที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing นำตัวอย่าง RNA ของใบปาล์มน้ำมัน 3 ตัวอย่าง หาลำดับเบส ข้อมูลลำดับเบสที่ได้จะได้ข้อมูลชุดของ Single-end reads ของแต่ละตัวอย่าง (reads คือรูปแบบของข้อมูลลำดับเบสสายสั้น โดยความยาวของ reads ที่ได้จะมีความยาวเฉลี่ย 30 ถึง 500 คู่เบส) จากการระบุจำนวนของ reads บนจีโนมอ้างอิงของปาล์มน้ำมันพบว่า จำนวน reads ที่มีความยาวประมาณ 150 คู่เบส บนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing ก่อนการคัดเลือก (filtering) มีจำนวนดังนี้คือ ตัวอย่างปาล์มน้ำมันชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า (Control) ได้จำนวน reads เท่ากับ 56470986 คิดเป็นจำนวน 8470647900 คู่เบส ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ Q20 เท่ากับ 97.24 และค่าเปอร์เซ็นต์ Q30 เท่ากับ 93.12 ตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า T11R3 (Susceptible) ได้จำนวน reads เท่ากับ 56381904 คิดเป็นจำนวน 8457285600 คู่เบส ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ Q20 เท่ากับ 97.15 และค่าเปอร์เซ็นต์ Q30 เท่ากับ 92.97 และตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า T7R3 (Tolerant) ได้จำนวน reads เท่ากับ 43357932 คิดเป็นจำนวน 6503689800 คู่เบส ที่ค่าเปอร์เซ็นต์ Q20 เท่ากับ 96.89 และค่าเปอร์เซ็นต์ Q30 เท่ากับ 92.23 (ตารางที่ 12)

หลังจากที่ได้คัดเลือก (filtering) เฉพาะ reads ที่มีคุณภาพเก็บไว้พบว่า จำนวน reads ที่มีความยาวประมาณ 149 คู่เบส บนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing หลังการคัดเลือก (filtering) มีจำนวนดังนี้คือ ตัวอย่างปาล์มน้ำมันชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า (Control) ได้จำนวน reads เท่ากับ 56288882 คิดเป็นจำนวน 8386831571 คู่เบส เปอร์เซ็นต์ Q20 เท่ากับ 97.44 และค่าเปอร์เซ็นต์ Q30 เท่ากับ 93.36 ส่วนตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า T11R3 (Susceptible) ได้จำนวน reads เท่ากับ 56195866 คิดเป็นจำนวน 8364665165 คู่เบส มีค่าเปอร์เซ็นต์ Q20 เท่ากับ 97.35 และค่าเปอร์เซ็นต์ Q30 เท่ากับ 93.21 และตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า T7R3 (Tolerant) ได้จำนวน reads เท่ากับ 43211538 คิดเป็นจำนวน 6431064725 คู่เบส มีค่าเปอร์เซ็นต์ Q20 เท่ากับ 97.09 และค่าเปอร์เซ็นต์ Q30 เท่ากับ 92.47 (ตารางที่ 13)

การระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสองตัวอย่าง (Differently expressed genes; DEGs) ประกอบส่วนของ reads เข้าด้วยกันใหม่ (assembly) ด้วยโปรแกรม Cufflinks แล้วใช้โปรแกรม Cuffdiff เพื่อที่จะระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสองตัวอย่าง (Differently expressed genes; DEGs) คือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า และหาจำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ตารางที่ 14 พบว่า จำนวน Contig (ประกอบมาจาก reads ที่มาต่อกัน) และ Unigene (Gene ที่มีรายงานในฐานข้อมูล) จากการวิเคราะห์ De novo assembly ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ได้จำนวน Contig เท่ากับ 7305620 sequences (จำนวนเส้นของลำดับนิวคลีโอไทด์) คิดเป็น 326826460 คู่เบส ค่า N50 เท่ากับ 44 คู่เบส (ค่ากลางของความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์) ส่วนจำนวน Unigene ที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 158028 sequences (จำนวนเส้นของลำดับนิวคลีโอไทด์) คิดเป็น 81092921 คู่เบส ค่า N50 เท่ากับ 732 คู่เบส (ค่ากลางของความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์)

จากตารางที่ 15 จะเห็นได้ว่า Unigene ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลทรานสคริปโตมของปาล์มน้ำมัน ทั้ง 3 ตัวอย่าง แยกตามขนาด ตั้งแต่ Unigene ขนาด 200-500 คู่เบส จำนวน 121422 ยีน คิดเป็น 76.84%, Unigene ขนาด 500-1000 คู่เบส จำนวน 17788 ยีน คิดเป็น 11.26%, Unigene ขนาด 1000-1500 คู่เบส จำนวน 8051 ยีน คิดเป็น 5.09%, Unigene ขนาด 1500-2000 คู่เบส จำนวน 5009 ยีน คิดเป็น 3.17%, Unigene ขนาดยาวกว่า 2000 คู่เบส จำนวน 5757 ยีน คิดเป็น 3.64% (ภาพที่ 44)

การ annotation (การระบุหน้าที่ของยีน) ของ Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมของปาล์ม น้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ด้วยฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน ได้แก่ Nr database ของ NCBI, COG database, Swissprot database และ KEGG database ผลพบว่าฐานข้อมูล Nr database ของ NCBI ระบุหน้าที่ของยีน ได้เท่ากับ 79767 ยีน รองลงมาคือ Swissprot database ระบุหน้าที่ของยีน ได้เท่ากับ 53257 ยีน, COG database ระบุหน้าที่ของยีน ได้เท่ากับ 39850 ยีน และ KEGG database ระบุหน้าที่ของยีน ได้เท่ากับ 21865 ยีน ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และภาพที่ 45)

Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ถูกจัดเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า สามารถวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน ได้เป็นกลุ่มหน้าที่ของยีน 3 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มยีนที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม Molecular function โดยหน้าที่ของยีนในกลุ่มที่แสดงออกมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ หน้าที่ในการ Binding และ Catalytic activity กลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกของยีนพบรองลงมาคือ กลุ่ม Cellular Component โดยหน้าที่ของยีนในกลุ่มที่แสดงออกมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ หน้าที่ในการเป็นส่วนประกอบของ Cell part และ Organelle ส่วนกลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกของยีนพบเป็นอันดับสามคือ กลุ่ม Biological Process โดยหน้าที่ของยีนในกลุ่มที่แสดงออกมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ หน้าที่ในการ Metabolic process และ cellular process และพบยีนที่มีการแสดงออกเกี่ยวกับ immune system process ซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคเป็นจำนวนน้อย (ภาพที่ 46) Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ถูกจัดเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า สามารถวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน โดยการวิเคราะห์ KEGG pathway ซึ่งผลพบว่ากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 5 กลุ่มแรก ประกอบด้วย Global and overview maps, Translation, Carbohydrate metabolism, Amino acid metabolism และ Folding, sorting and degradation ตามลำดับ(ภาพที่ 47)

ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า ประกอบด้วยยีนที่มีการแสดงออกสูงขึ้นจำนวน 4304 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลงเท่ากับ 2743 ยีน ส่วนในชุดข้อมูลชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าประกอบด้วยยีนที่มีการแสดงออกสูงจำนวน 2040 ยีน และยีนที่มีการแสดงออกลดลงเท่ากับ 1645 ยีน (ภาพที่ 48) เมื่อแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง จาก 2 ชุดข้อมูลด้วยแผนภาพเวนน์พบว่า ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่ามีการแสดงออกของยีน 3370 ยีน และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่ามีการแสดงออกของยีน 2751 ยีน และมียีนที่มีการแสดงออกเหมือนกัน 934 ยีน (ภาพที่ 49) โดยแสดงตัวอย่างยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในชุด

ควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า ซึ่งมีทั้งการแสดงออกที่สูงขึ้น (Up regulation) และการแสดงออกของยีนที่แสดงออกลดลง (Down regulation) และแสดงตัวอย่างยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ซึ่งมีทั้งการแสดงออกที่สูงขึ้น (Up regulation) และการแสดงออกของยีนที่แสดงออกลดลง (Down regulation)

การค้นหาน้ำที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน ใช้โปรแกรม Gene ontology เพื่อค้นหาน้ำที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน สร้างแผนภาพจำนวน 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า จาก ภาพที่ 50 จะเห็นได้ว่า Differentially expressed genes, DEG (ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน) ใน 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาน้ำที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน ได้เป็นกลุ่มน้ำที่ของยีน 3 กลุ่มด้วยกันคือ กลุ่มยีนที่พบมากที่สุดคือ กลุ่ม Cellular Component โดยน้ำที่ของยีนในกลุ่มที่แสดงออกมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ น้ำที่ในการเป็น Integral component of membrane และ plasma membrane กลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกของยีนพบรองลงมาคือ กลุ่ม Molecular function โดยน้ำที่ของยีนในกลุ่มที่แสดงออกมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ น้ำที่เกี่ยวกับ ATP binding และ structural constituent of ribosome ส่วนกลุ่มของยีนที่มีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุดคือ กลุ่ม Biological Process โดยน้ำที่ของยีนในกลุ่มที่แสดงออกมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ น้ำที่ในการ translation และ Cell wall organization ซึ่งยีนที่มีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันใน 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า น่าจะเป็นยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานต่อโรคลำต้นเน่า จากภาพที่ 51 จะเห็นได้ว่า Differentially expressed genes, DEG (ยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน) ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ถูกจัดเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า สามารถวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน โดยการวิเคราะห์ KEGG pathway ผลพบว่ากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 5 กลุ่มแรกประกอบด้วย Ribosome, Ribosome biogenesis in eukaryotes, Plant hormone signal transduction, RNA transport, Protein processing in endoplasmic reticulum ตามลำดับ ซึ่งยีนที่มีการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันใน 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า น่าจะเป็นยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความต้านทานต่อโรคลำต้นเน่า

การออกแบบไพรเมอร์และทดสอบความใช้ได้สำหรับแยกความแตกต่างระหว่างปาล์มน้ำมันทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า นำข้อมูลตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีความแตกต่างกัน ระหว่างระหว่างปาล์มน้ำมันทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ตารางที่ 17 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม Vector NTI (invitrogen) (<https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA

Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล ส่งเคราะห์คู่ไพรเมอร์เพื่อใช้จำแนกปาล์มน้ำมันทนทานต่อโรคลำต้นเน่า

ตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมันด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสพบว่า สามารถพบแถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์ และได้แถบดีเอ็นเอชัดเจน

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของปาล์มน้ำมันทั้ง 10 สายพันธุ์ที่ได้จากการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้จำแนกปาล์มน้ำมันทนทานต่อโรคลำต้นเน่าพบว่า ไม่มีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน

ตารางที่ 12 แสดงจำนวน reads บนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing ก่อนการคัดเลือก (filtering)

ตัวอย่าง	ความยาวของ reads (bp)	จำนวน reads ทั้งหมด (bp)	คู่เบส (bp)	Q20 (%)	Q30 (%)
สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า (T11R3)	150	43357932	6503689800	96.89	92.23
สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า (T7R3)	150	56381904	8457285600	97.15	92.97
สายพันธุ์ควบคุม	150	56470986	8470647900	97.24	93.12

ตารางที่ 13 แสดงจำนวน reads บนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ได้จากการวิเคราะห์ RNA-sequencing หลังการคัดเลือก (filtering)

ตัวอย่าง	ความยาวของ reads (bp)	จำนวน reads ทั้งหมด (bp)	คู่เบส (bp)	Q20 (%)	Q30 (%)
สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า (T11R3)	148.83	43211538	6431064725	97.09	92.47
สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า (T7R3)	148.85	56195866	8364665165	97.35	93.21
สายพันธุ์ควบคุม	149	56288882	8386831571	97.44	93.36

ตารางที่ 14 แสดงจำนวน Contig และ Unigene จากการวิเคราะห์ De novo assembly

ชนิด	จำนวน Sequence (bp)	จำนวนคู่เบส (bp)	ค่ากลางของความยาวของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (N50)
Contig	7305620	326826460	44
Unigene	158028	81092921	732

ตารางที่ 15 แสดงการกระจายตัวของ Unigene จากข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง แยกตามขนาด

คู่เบส	คู่เบส ทั้งหมด	คู่เบส ขนาด <200	คู่เบส ขนาด 200-500	คู่เบส ขนาด 500-1000	คู่เบส ขนาด 1000- 1500	คู่เบส ขนาด 1500- 2000	คู่เบส ขนาด>2000
จำนวน	158028	0	121422	17788	8051	5009	5757
เปอร์เซ็นต์	100	0	76.84	11.26	5.09	3.17	3.64

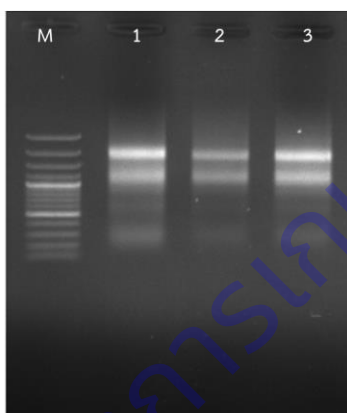
ตารางที่ 16 แสดงการ annotation (การระบุหน้าที่ของยีน) ของ Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ด้วยฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน

จำนวนยีนทั้งหมด	ฐานข้อมูล Nr	ฐานข้อมูล COG	ฐานข้อมูล Swissprot	ฐานข้อมูล KEGG
158028	79767	39850	53257	21865

ตารางที่ 17 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีความแตกต่างกัน ระหว่างระหว่างปาล์มน้ำมันทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า

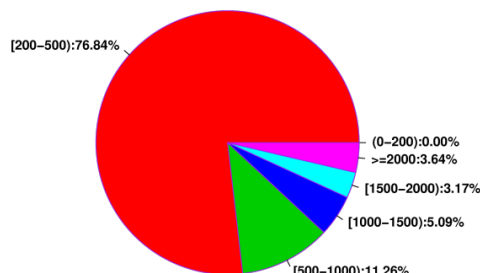
ลำดับ	หมายเลขยีน (Gene ID)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	จำนวนเบสซ้ำ (SSR repeat number)	ตำแหน่ง
1	DN64538_c0_g3_i1	CCACCACCACCACCA	3	74,97
2	DN23040_c0_g1_i1	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	3	41,76
3	DN72840_c0_g2_i1	AAGAAGAAGAAGAAG	3	60,83
4	DN148562_c0_g1_i1	AGCAGCAGCAGCAGC	3	56,79
5	DN75508_c0_g1_i1	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	3	84,110
6	DN67878_c0_g1_i1	CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG	3	44,73
7	DN58676_c0_g1_i1	ATTTATTTATTTATTTATTTATTT	4	27,59
8	DN97681_c0_g1_i1	TTATTTATTTATTTATTTAT	4	78,106
9	DN77808_c3_g1_i2	TTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGG	5	183,216

ลำดับ	หมายเลขยีน (Gene ID)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	จำนวนเบสซ้ำ (SSR repeat number)	ตำแหน่ง
10	DN72891_c0_g1_i2	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	3	37,63
11	DN76164_c0_g5_i2	AGAAGAAGAAGAAGA	3	163,186
12	DN78026_c0_g2_i3	GACGACGACGACGACGAC	3	149,178
13	DN12978_c0_g5_i1	TCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT	3	58,90
14	DN74824_c0_g1_i2	TCATCATCATCATCATCA	3	207,233
15	DN23040_c0_g1_i2	AGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC	3	41,76

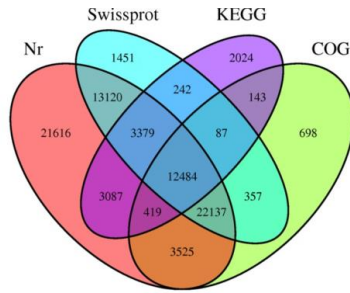


ภาพที่ 43 การตรวจคุณภาพอาร์เอ็นเอของตัวอย่างปาล์มน้ำมันจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยแถวที่ 1 สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า (T11R3); แถวที่ 2 สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า (T7R3); แถวที่ 3 สายพันธุ์ควบคุม; M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Marker

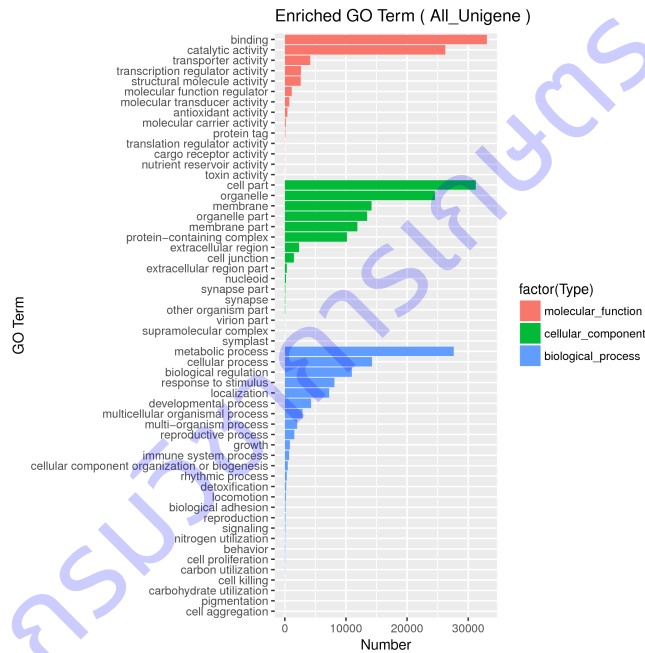
Pie chart for Unigene length



ภาพที่ 44 กราฟวงกลมแสดงเปอร์เซ็นต์การกระจายตัวของ Unigene ที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง แยกตามขนาด



ภาพที่ 45 แผนภาพแสดงการระบุหน้าที่ของ Unigene ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ด้วยฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน ได้แก่ Nr database ของ NCBI, COG database, Swissprot database และ KEGG database



ภาพที่ 46 แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีน จาก 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง

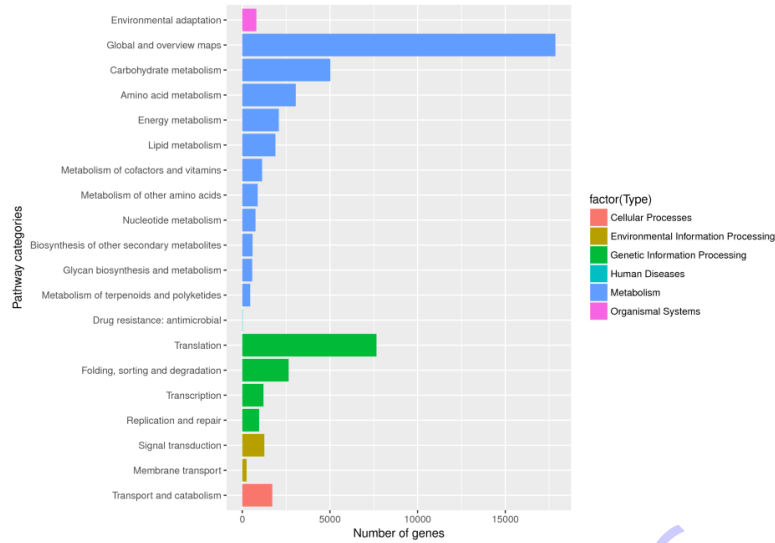
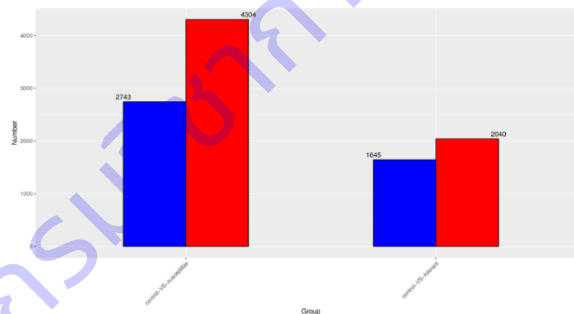
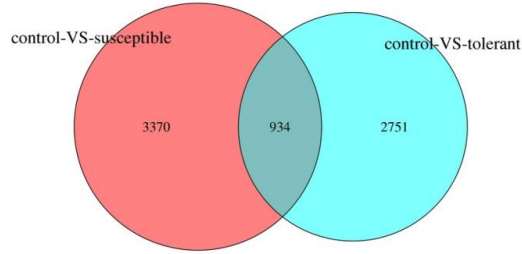


Figure 3.4.4.1 KEGG classification

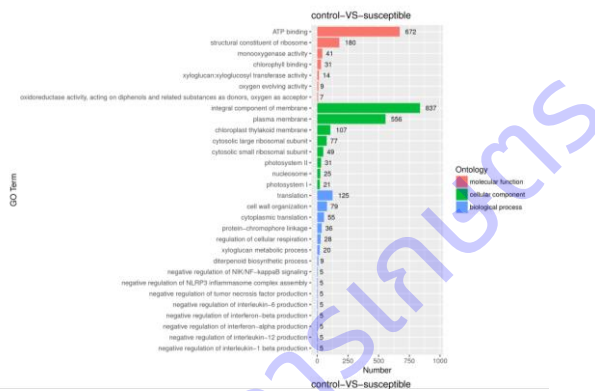
ภาพที่ 47 แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีนจาก 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง โดย KEGG pathway



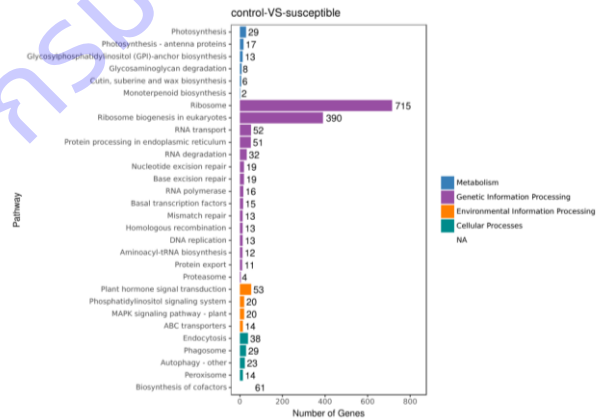
ภาพที่ 48 แสดงจำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง ที่ถูกจัดเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า (สีน้ำเงินคือ Down regulation สีแดงคือ Up regulation)



ภาพที่ 49 แผนภาพเวนน์แสดงความสัมพันธ์ของจำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง จาก 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้าเทียบสายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า



ภาพที่ 50 แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาหน้าที่และความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันใน 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง



ภาพที่ 51 แสดงการวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในชุดข้อมูล 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/ สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า ของข้อมูลทรานสคริปโตมบนจีโนมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่าง โดย KEGG pathway

การศึกษาการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าของต้นกล้าปาล์มน้ำมัน อายุ 3-5 เดือน จากการศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณจำนวนสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ในวัสดุทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดเกล็ด เมล็ดข้าวฟ่าง และเมล็ดข้าวเปลือกโดยเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* sp. ในวัสดุทั้ง 4 ชนิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง หลังการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน พบว่า เริ่มมีการเจริญเฉพาะบนข้าวโพดเกล็ด หลังบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 วัน พบว่า มีการเจริญเพิ่มขึ้นบนข้าวโพดเกล็ด และเริ่มมีการเจริญบนเมล็ดข้าวโพด เมล็ดข้าวฟ่าง และเมล็ดข้าวเปลือก เมื่อบ่มต่อเป็นเวลา 10 วัน พบว่า เชื้อมีการเจริญในข้าวโพดเกล็ดได้ดีที่สุด รองลงมา คือ เมล็ดข้าวโพด เมล็ดข้าวฟ่าง และเมล็ดข้าวเปลือก ตามลำดับ จากนั้นล้างสปอร์และนับปริมาณสปอร์ด้วย Haemocytometer และคำนวณความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ พบว่า ข้าวโพดเกล็ด มีความหนาแน่นของจำนวนสปอร์มากที่สุด คือ 2.29×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ เมล็ดข้าวโพด 1.92×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมล็ดข้าวเปลือก 1.77×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และเมล็ดข้าวฟ่าง 1.64×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี LSD (ตารางที่ 63) เมื่อทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตต่อหน่วยของวัสดุแต่ละชนิด พบว่า เมล็ดข้าวฟ่าง มีราคาแพงที่สุด คือ 5.63 บาท รองลงมาคือ ข้าวโพดเกล็ด เมล็ดข้าวโพด และเมล็ดข้าวเปลือกมีราคาใกล้เคียงที่ 1.94 1.93 และ 1.80 บาท ตามลำดับ ดังนั้นข้าวโพดเกล็ดจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Streptomyces* sp. ในด้านการเพิ่มจำนวนของสปอร์และต้นทุนการผลิตต่อหน่วย

ตารางที่ 18 ความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ *Streptomyces* sp. บนวัสดุต่าง ๆ

วัสดุ	ความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ <i>Streptomyces</i> sp. (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
เมล็ดข้าวโพด	1.92×10^8 b
ข้าวโพดเกล็ด	2.29×10^8 a
เมล็ดข้าวฟ่าง	1.64×10^8 d
เมล็ดข้าวเปลือก	1.77×10^8 c
C.V. (%)	2.98

หมายเหตุ ตัวเลขในสมมติเดียวกันที่มีอักษรเดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี LSD

การทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีด้วยการฉีดเข้าลำต้นเพื่อป้องกันกำจัดหนอนหน้าแมวในปาล์มน้ำมัน ในการทดลองต้องหาสวนปาล์มน้ำมันที่มีหนอนหน้าแมวระบาด ้วย และปริมาณหนอนหน้าแมวของแปลงเกษตรกร อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี มีไม่มากพอที่จะทำการทดลอง จึงได้เตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับการทดลองไว้ เพื่อให้ทันกับการระบาดของหนอนหน้าแมว และเฝ้าติดตามระวังฤดูการระบาดรอบถัดไป เพื่อทำการทดลองฉีดสารเข้าลำต้น (ภาพที่ 52)



ภาพที่ 52 สสำรวจการระบาดของหนอนหน้าแมวในแปลงเกษตรกร อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี

การทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีด้วยการฉีดเข้าลำต้นเพื่อป้องกันกำจัดหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน สวนปาล์มน้ำมันที่ทำการทดลองฉีดสารเข้าลำต้นในแปลงของเกษตรกร นายสุรินทร์ ศรีสว่าง ม.5 บ้านฝายท่า ตำบลบางสวรรค์ อำเภอพระแสง จังหวัดสุราษฎร์ธานี ได้ดำเนินการฉีดสารเคมีตามที่กำหนด เพื่อกำจัดหนอนปลอกเล็กเมื่อวันที่ 11 พฤศจิกายน 2566 ซึ่งอยู่ระหว่างเก็บข้อมูล 90 วัน หลังฉีดสารเข้าลำต้น (ภาพที่ 53)



ภาพที่ 53 ฉีดสารเข้าลำต้นแปลงปาล์มน้ำมันที่มีการระบาดของหนอนปลอกเล็ก

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตาม คำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่ เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบ หลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
1. เทคโนโลยี/ กระบวนการใหม่ ระดับ ห้องปฏิบัติการ	7	กระบวนการ ใหม่	1. เทคโนโลยี/ กระบวนการใหม่ ระดับ ห้องปฏิบัติการ	7	กระบวนการ ใหม่	1. โพรเมอร์ที่จำเพาะและ ความไวของโพรเมอร์ใน การตรวจหาเชื้อไฟโต พลาสมาด้วยเทคนิค multiplex PCR (หลักฐานที่ 1)	ข้อมูลโพรเมอร์ที่ออกแบบ คู่ที่ 1 cwbF1 (5'- TATGCTTAGGGAGGAGCTTGCCTCA CA-3') cwbr1 (5'- TTTACCACTACACATGGAATTCCACT TGCC-3') คู่ที่ 2 cwblF2 (5'- TTTACCACTACACATGGAATTCCACT TGCC-3') cwbr2 (5'- TGCTGGCACATAATTAGCCGGGGCT TATTCATC-3')
						2. โพรเมอร์ที่จำเพาะและ ความไวของโพรเมอร์ใน การตรวจหาเชื้อไฟโต พลาสมาด้วยเทคนิค LAMP (หลักฐานที่ 2)	ข้อมูลโพรเมอร์ที่ออกแบบ คู่ที่ 1 F3 (5'- CCACGCCGTAAACGATGAG-3') B3(5'- GCTGTAGAAACACAGTGGAGGTT-3') คู่ที่ 2 F2 (5'- ACGTTGGGTAAAACCAAGTGT-3') B2 (5'-TCGAAGGTACCCGAAAAACC-3') คู่ที่ 3 F1 (5'- TCCGCCTGAGTAGTACGTACGC-3') B1 (5'-AAGGAATTGACGGGA -3')
						3. ชนิดของสารปฏิชีวนะ และค่าความเข้มข้นใน ระดับเบื้องต้นที่สามารถ ขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาใน มันสำปะหลังเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อได้ (หลักฐานที่ 3)	สารปฏิชีวนะจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เต ตระไซคลิน และโรแฟมพิซิน ที่เข้มข้น 50 ppm พบว่า สามารถกำจัดเชื้อไฟโต พลาสมาในมันสำปะหลังเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อได้
						4. ลักษณะทางสัณฐาน วิทยาของเชื้อสาเหตุโรค เหี่ยวเน่าแดง (หลักฐานที่ 4)	- ข้อมูลเชื้อ <i>Colletotrichum falcatum</i> มี เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคลนีสีขาว เทา และเทาเข้มถึงดำ - ข้อมูลเชื้อเชื้อรา <i>Fusarium moniliforme</i> มีเส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคลนีสีขาว อมชมพูถึงม่วง เชื้อสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน รูปร่าง macroconidia ยาวเรียวโค้งหรือ เกือบตรง

ผลผลิตตาม คำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่ เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบ หลักฐาน)**	เชิงคุณภาพ
						5. ข้อมูลประชากรของ จักจั่นและศัตรูธรรมชาติ (หลักฐานที่ 5)	ข้อมูลการระบาดของจักจั่นอ้อยในพื้นที่ ปลูกอ้อยของเกษตรกร 5 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และกาญจนบุรี
						6. ข้อมูลจำนวนไอโซเลท ของเชื้อรา <i>Ganoderma</i> sp. (หลักฐานที่ 6)	ข้อมูลไอโซเลทของเชื้อรา <i>Ganoderma</i> sp. 41 ไอโซเลท ได้แก่ จังหวัดกระบี่ 21 ไอโซเลท คือ KBI01 KBI02 KBI03 KBI04 KBI05 KBI06 KBI07 KBI08 KBI09 KBI10 KBI11 KBI12 KBI13 KBI14 KBI15 KBI16 KBI17 KBI18 KBI19 KBI20 และ KBI21 จังหวัดตรัง 2 ไอโซเลท คือ TRG01 และ TRG02 จังหวัดนครศรีธรรมราช 6 ไอโซเลท คือ NRT01 NRT02 NRT03 NRT04 NRT05 และ NRT06 จังหวัดสุราษฎร์ ธานี 10 ไอโซเลท คือ SNI01 SNI02 SNI03 SNI04 SNI05 SNI06 SNI07 SNI08 SNI09 และ SNI10 จังหวัดชุมพร 1 ไอโซเลท คือ CPN01 และจังหวัด ปทุมธานี 1 ไอโซเลท คือ PTI01
						7. ไพร์เมอร์จากกลุ่มยีน ทนทานโรคลำต้นเน่าใน ปาล์มน้ำมัน (หลักฐานที่ 7)	ไพร์เมอร์ของยีน EglFR คือ EglFR_F (AAGCTCCTGGACGACTTCAA) EglFR_R (ATGGGAGGAAGTAACCAGCA) และ ไพร์เมอร์ของยีน EglMT-1 คือ EglMT- 1_F (AGGCAAATGTGGCTGTGGCGTT) EglMT-1_R (ACTTGCAAGTTGCAGCCTCCGTT) ใช้ จำแนกความแตกต่างระหว่างลำดับนิว คลีโอไทด์ของสายพันธุ์ทนทานและไม่ ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน
			2. ต้นฉบับ บทความวิจัย (Manuscript) นำเสนอในการ ประชุมวิชาการ เกษตรครั้งที่ 24 ปี ค.ศ. เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	1	เรื่อง	บทความนำเสนอภาค โปสเตอร์ เรื่อง การ พัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการ จำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาว โรคใบ ขาวแตกกอยและโรค กอตะไคร้ในครั้งเดียว (หลักฐานที่ 8)	การบ่งชี้ชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค Multiplex-PCR ในการ จำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค ใบขาว โรคใบขาวแตกกอยและ โรคกอตะไคร้ในครั้งเดียว

* ใส่ผลผลิตที่ได้ตามคำรับรอง

** หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตให้แสดงรายละเอียดในภาคผนวก และแนบไฟล์ เรียงตามลำดับผลผลิต

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
1. ไพรเมอร์ที่จำเพาะและความไวของไพรเมอร์ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาถูกนำมาพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค multiplex PCR	2566
2. ไพรเมอร์ที่จำเพาะและความไวของไพรเมอร์ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา ถูกนำมาพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP	2566
3. ชนิดของสารปฏิชีวนะและค่าความเข้มข้นในระดับเบื้องต้นที่สามารถจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ สารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ppm นำไปทดสอบการลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	2566
4. ข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดงถูกนำไปใช้ในการจัดจำแนกในระดับโมเลกุลต่อไป และนำเชื้อสาเหตุโรคที่ได้ไปใช้ในการประเมินความรุนแรงของเชื้อโรคเหี่ยวเน่าแดงในสภาพโรงเรือนเพื่อนำไปใช้ต่อยอดงานวิจัยเพื่อให้ได้เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวเน่าแดงในอ้อย	2566
5. ข้อมูลประชากรของจักจั่นและศัตรูธรรมชาติถูกนำไปปรับใช้ในการศึกษาแนวทางการป้องกันกำจัดจักจั่นอ้อยในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพไร่ต่อไป	2566
6. ข้อมูลจำนวนไอโซเลทของเชื้อรา <i>Ganoderma</i> sp. เอาไปจำแนกชนิดของเชื้อราระดับสปีชีส์และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต่อไป	2566
7. ไพรเมอร์จากกลุ่มยีนทนทานโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันนำไปใช้สำหรับจำแนกสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่มีลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าในระดับโมเลกุลต่อไป	2566
8. นักวิชาการทั้งภาครัฐและเอกชนหรือผู้เกี่ยวข้องได้รับองค์ความรู้เรื่องการพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอยและโรคกอตะไคร้อ้อยในครั้งเดียว และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยหรือนำไปปรับใช้ในการตรวจคัดกรองท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดปลอดโรคใบขาวได้	2566

*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output) ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ : เกษตรกร นักวิชาการทั้งภาครัฐและเอกชน นำเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแจ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยในระดับเนื้อเยื่อ โรคเหี่ยวเน่าแดงอ้อย ดัชนีหวาดยาวอ้อย และจักจั่นอ้อย และเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่า หนอนหน้าแมว และหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมันไปประยุกต์ใช้ในการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมันได้อย่างเหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เกษตรกรสามารถลดการระบาดของศัตรูพืชและมีการผลิตพืชที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีผลผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นและมีรายได้เพิ่มขึ้นหลังจากนำเทคโนโลยีไปใช้ประโยชน์	2568
ด้านสังคม : ถ่ายทอดเทคโนโลยีและองค์ความรู้ การควบคุมไรแดงโดยใช้ศัตรูธรรมชาติ การป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาวอ้อยและจักจั่นอ้อยโดยใช้สารชีวภัณฑ์หรือสารป้องกันกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพ และการใช้เชื้อราปฏิชีวนะควบคุมเชื้อโรคเหี่ยวเน่าแดงในอ้อย โรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน การควบคุมหนอนหน้าแมวและหนอนปลอกเล็กใน	2568

<p>ปาล์มน้ำมัน ให้แก่เกษตรกรหรือกลุ่มเกษตรกร เพื่อขยายผลต้นแบบเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยสู่การนำไปใช้ประโยชน์ในพื้นที่ที่มีปัญหาได้อย่างเหมาะสม รวมทั้งถ่ายทอดให้ผู้ประกอบการ นักวิจัย นักวิชาการในกรมวิชาการ เกษตร หน่วยงานภาครัฐและเอกชนนำไปขยายผลต่อไป เพื่อให้ผลงานวิจัยถึงมือเกษตรกร และเกษตรกรมีความมั่นใจในการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และปาล์มน้ำมัน สามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นได้ มีความมั่นใจในอาชีพและรายได้ มีความมั่นคง ที่ความสุขในการประกอบอาชีพ สังคมเป็นสุข</p>	
<p>ด้านสิ่งแวดล้อม : ถ่ายทอดเทคโนโลยีและองค์ความรู้ การควบคุมไรแดงโดยใช้ศัตรูธรรมชาติ การป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาวอ้อยและจักจั่นอ้อยโดยใช้สารชีวภัณฑ์หรือสารป้องกันกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพ และการใช้เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมเชื้อโรคเหี่ยวเน่าแดงในอ้อย โรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน การควบคุมหนอนหน้าแมวและหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน ให้แก่เกษตรกร ผู้ประกอบการ รวมทั้งนักวิจัย นักวิชาการในกรมวิชาการเกษตร หน่วยงานภาครัฐและเอกชนเพื่อขยายผลต้นแบบเทคโนโลยีที่ได้จากงานวิจัยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลัง อ้อย และและปาล์มน้ำมัน และลดการใช้สารเคมีในการผลิตพืชได้</p>	2568

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ด้านวิชาการ โดย บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา 3 รับการถ่ายทอดวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยโดยใช้เทคนิค LAMP เพื่อตรวจคัดกรองโรคใบขาวอ้อยในแปลงพันธุ์ก่อนนำไปขยายพันธุ์ให้กับเกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรได้พันธุ์อ้อยที่สะอาดและปลอดโรคใบขาว (หลักฐานที่ 9)

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคพุ่มแฉ้และไรแดงศัตรูมันสำปะหลัง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาจากแปลงมันสำปะหลังจำนวน 326 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Nested PCR จำนวน 210 ตัวอย่าง และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจากตัวแทนกลุ่มพืชและวัชพืชกับข้อมูลยีนเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 10 กลุ่มที่มีรายงานใน Genbank พบว่า R87 (กระต่ายจาม, ระยอง) NK11 (ผักโขมหินต้นตั้ง, นครสวรรค์) และ MPB (ไมยราบ, เพชรบูรณ์) ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาในมะนาว (accession number U15442) โดยเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrlI และตัวแทนของพืชและวัชพืชชนิดอื่นแยกกลุ่มออกไป และจากการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีต่อกิ่งจากต้นที่เป็นโรคสู่ต้นปกติ และจากต้นปกติไปยังต้นที่เป็นโรคนั้นไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาไปยังอีกต้นหนึ่งได้ อาจเกิดจากการที่เชื้อไฟโตพลาสมามีปริมาณไม่เพียงพอที่จะทำให้ต้นมันสำปะหลังแสดงอาการผิดปกติ ดังนั้นในการทดลองปี 2566 นั้น มีแผนการดำเนินการคือ นำฝอยทอง *Cuscuta campestris* Yunker และ *Cuscuta chinensis* Lam. นำมาถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ้มันสำปะหลัง เช่นเดียวกับการทดลองของ โสภิตา และคณะ (2560) ที่นำฝอยทองทั้งสองชนิดมาถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคดอกเขียวของแพงพวย และจากการศึกษาการถ่ายทอดโรคแตกพุ่มฝอยของงาและปอเทืองโดยใช้ฝอยทอง (สุภาพร, 2534) จากการพัฒนาเทคนิค multiplex PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาจากมันสำปะหลัง ผลการนำตัวอย่างมันสำปะหลังมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ทดสอบการ cross amplification กับไฟโตพลาสมาในพืชชนิดอื่นๆ ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา Ca. P. 16SrlI group และ 16SrlII group ในมันสำปะหลังและสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ้ในพืชอื่น ๆ เช่น สาบม่วง และหญ้าหนวดน้อย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับต้นพืชปกติ สอดคล้องกับการรายงานของประเทศไทยมีรายงานการพบโรคพุ่มแฉ้ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrlI (สุภาพร และคณะ, 2559) และ Moonjuntha et al. (2018) ที่ได้ดำเนินการสำรวจโรคพุ่มแฉ้ในประเทศไทยจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังพบเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrlII ในส่วนของการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบขึ้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคพุ่มแฉ้ในมันสำปะหลัง โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย โดยเทคนิคดังกล่าวใช้ระยะเวลาตรวจสอบเพียง 65 นาที และสามารถอ่านผลได้ง่าย ในส่วนของการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อการขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาก่อโรคพุ่มแฉ้มันสำปะหลังในสภาวะเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ความเข้มข้นที่ระดับ 50 และ 100 ppm ของสารปฏิชีวนะทั้งสองชนิดสามารถขจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ ในส่วนของกิจกรรมที่ 2 พบว่า จากการการศึกษการเจริญเติบโตในสภาพห้องปฏิบัติการพบว่า ไรแดงเพศผู้มีระยะเวลาการเจริญเติบโตเฉลี่ยในระยะไข่ ระยะตัวอ่อนวัย 1 ระยะพักที่ 1 ระยะตัวอ่อนวัย 2 ระยะพักที่ 2 ระยะตัวอ่อนวัย 3 ระยะพักที่ 3 และระยะเวลาจากไข่ถึงตัวเต็มวัย เท่ากับ 3.00 0.73 0.55 0.51 0.58 0.71 0.69 และ 6.77 วัน และเพศเมียมีระยะเวลาการเจริญเติบโตเฉลี่ยในระยะไข่ ระยะตัวอ่อนวัย 1 ระยะพักที่ 1 ระยะตัวอ่อนวัย 2 ระยะพักที่ 2 ระยะตัวอ่อนวัย 3 ระยะพักที่ 3 และระยะเวลาจากไข่ถึงตัวเต็มวัย เท่ากับ 3.00 0.79 0.57 0.53 0.60 1.00 0.73 และ 7.21 วัน ส่วนการทดสอบความต้านทานต่อไรแดงมันสำปะหลังของมันสำปะหลังพันธุ์ 16 พันธุ์ ในสภาพโรงเรือน หลังจากปล่อยไรแดงมันสำปะหลังพบว่า มีปริมาณ

ไรแดงต่อบและ ความเสียหายเฉลี่ยเพิ่มมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 2 3 และมากที่สุด ในสัปดาห์ที่ 4 และพบมี 4 พันธุ์ที่มี ลักษณะความเสียหายน้อยกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ พันธุ์ระยอง 1 ระยอง 3 ระยอง 13 และระยอง 60 สัปดาห์ที่ 5 ต้น มันสำปะหลังมีลักษณะอาการใบซีดขาวถึงเหลือง มีเส้นใยปกคลุมบริเวณใบ ไรเดินตามลำต้นและกระถางเพื่อหา แหล่งอาหารใหม่

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูอ้อย

การป้องกันกำจัดโรคอ้อยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา เทคนิค Multiplex-PCR สามารถจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 3 ชนิด ได้แก่ white leaf, grassy shoot และ green grassy shoot มีความไวตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ได้เจือจางถึง 10^{-6} ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยทดสอบการ cross amplification กับไฟโตพลาสมา ในพืชชนิดอื่น ๆ วิธีการใหม่นี้ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ทำให้สามารถรู้ผลการตรวจได้รวดเร็วและไม่มีการปนเปื้อนในปฏิกิริยาควคุม เป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจโรคไฟโตพลาสมาในอ้อยได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และรวดเร็ว จากการประเมินศักยภาพของเทคนิค Multiplex-PCR กับเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พบว่า สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคทั้งสามได้อย่างมีประสิทธิภาพไพรเมอร์ สำหรับเทคนิค LAMP จากบริเวณยีน imp โดย Primer Explorer program version5 โดยชุดของ primer โดย 1 ชุด มีจำนวน 6 เส้น (รวมทั้งด้าน Forward และ Reverse) ซึ่งลำดับของนิวคลีโอไทด์ใน primer ต้องออกแบบ อย่างจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย (target sequence) จำนวน 6 บริเวณ โดย primer ประกอบไปด้วย inner primers จำนวน 2 เส้น (FIP และ BIP) ทำหน้าที่สร้าง loop และ outer primers จำนวน 2 เส้น (F3 และ B3) ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน imp จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย ได้แก่ Sugarcane white leaf Sugarcane green glassy shoot และ Sugarcane glassy shoot สามารถออกแบบไพรเมอร์ ได้จำนวน 1 คู่ การโคลนยีน imp เชื่อมกับเวกเตอร์ pTZ57R/T vector และเคลื่อนย้ายพลาสมิดที่มียีน imp เข้าสู่ component cells เชื้อ E.coli สายพันธุ์ JM109 คัดเลือกเชื้อที่ ได้รับยีนเข้าไปตรวจสอบยีนโดยวิธี PCR ที่ใช้ คู่ primer IMP2F / IMP2R จำนวน 10 โคลนี เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ในกลีเซอรอล 50 % ประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในสภาพเนื้อเยื่ออ้อย ได้ตัวอย่างอ้อยสำหรับทดสอบคัดเลือกต้นอ้อยเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคัดเลือกต้นอ้อยที่มีอายุประมาณ 1 เดือน ความสูงประมาณ 20 เซนติเมตร ตัดใบเพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อ ใช้ต้นที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μl ระดับสีส้ม และต้นที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μl ระดับสีฟ้า ได้ตัวอย่างอ้อยสำหรับชักนำให้เกิดเป็นแคลลัส และได้แคลลัสจากอ้อยที่มีปริมาณเชื้อ 100 copy/ μl อยู่ที่ระดับสี ส้ม และต้นที่มีปริมาณเชื่อน้อยกว่า 5 copy/ μl อยู่ที่ระดับสีฟ้า ประสิทธิภาพสาร secondary metabolite ของ เชื้อ *Streptomyces* ในการยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย แยกเชื้อ *Streptomyces* จาก ตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อยในแปลงปลูกอ้อยพื้นที่จังหวัดขอนแก่น แยกเชื้อบนอาหาร AGMA สามารถแยก เชื้อได้จำนวน 6 ไอโซเลต โดยประสิทธิภาพของเชื้อ *Streptomyces* ในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดงใน สภาพอาหารเลี้ยงเชื้อได้เชื้อ *Streptomyces* จำนวน 3 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ส่วนประสิทธิภาพของ แหล่งไนโตรเจนเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้อ้อยที่ติดเชื้อใบขาว โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากอ้อยในแปลงปลูก อ้อยพื้นที่จังหวัดขอนแก่น ได้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 50 ไอโซเลต โดยทดสอบในอ้อยต่อไปใน ปี 2566

การป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวเน่าแดงในอ้อย ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดง ในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยเชื้อรา จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อรา *C. falcatum* และเชื้อรา *F. moniliforme*

โดยได้สำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคมะแอกเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ สามารถแยกเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ได้จำนวน 103 ไอโซเลท เชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 32 ไอโซเลท สำหรับเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สามารถจัดกลุ่มเบื้องต้นตามลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้จำนวน 6 กลุ่ม ตามวิธีการของ Sutton (1980) นำตัวแทนเชื้อราทั้ง 6 กลุ่มมาเลี้ยงบนอาหารต่างชนิดกัน จากนั้นวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าโคโลนีของเชื้อรา *C. falcatum* เจริญได้ดีบนอาหาร OMA MEA และ PDA มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.5 - 8.0 เซนติเมตร 6.8 - 7.2 เซนติเมตร และ 6.5 - 6.7 เซนติเมตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคโลนีมีสีขาวยาว และเทาเข้มถึงดำ สร้างกลุ่มสปอร์สีส้มจำนวนมากโคโลนีบนอาหาร OMA สร้างสปอร์เซลล์เดี่ยว รูปร่างโค้ง (falcate) ขนาด 20-30 x 4-5 ไมโครเมตร สร้างแอฟเพรสซอเรีย ขนาด 9-13 x 11-12 ไมโครเมตร สร้าง seta ขนาด 100-300 x 4-9 ไมโครเมตร สำหรับเชื้อรา *Fusarium* spp. สามารถจัดกลุ่มเบื้องต้นตามลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้จำนวน 5 กลุ่ม เมื่อนำเชื้อรา *F. moniliforme* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า โคโลนีของเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคโลนีมีสีขาวยาว อมชมพูถึงม่วง เชื้อสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน รูปร่าง macroconidia ยาวเรียวโค้งหรือเกือบตรง มี 3-5 septate หรืออาจมากกว่านั้น ขนาด 3.2-3.7 x 32.7- 43.5 ไมโครเมตร apical cell โค้งเล็กน้อย ปลายเรียว พบจำนวนน้อย microconidia เซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) หรือรูปไข่ (oval) ขนาด 2.3-2.6 x 5.9-7.3 ไมโครเมตร ถูกสร้างจำนวนมาก เกิดแบบกลุ่ม (false heads) หรือเรียงต่อกันเป็นโซ่ (chains) บน phialide บนปลายก้าน conidiophore พบน้อยที่เกิดจาก phialide ที่เจริญจากเส้นใยโดยตรง สำหรับการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อราสาเหตุ ปัจจุบันได้คัดเลือกเชื้อสาเหตุที่มีความรุนแรงที่สุดในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี ได้แก่ ไอโซเลทสามซึก สำหรับศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อราต่อไป สำหรับการประเมินความรุนแรงของเชื้อสาเหตุในสภาพโรงเรือน โดยเลือกทดสอบกับอ้อยพันธุ์การค้าที่มีในปัจจุบันและพันธุ์อ้อยที่มีรายงานค่าปฏิกิริยาต่อโรคเหี่ยวเน่าแดง จำนวน 13 พันธุ์ พบว่า พันธุ์ UT3 เกิดโรครุนแรงที่สุด โดยเกิดแผลลุกลามภายในปล้องอ้อยมากกว่าพันธุ์อื่น ซึ่งตรงตามการรายงานของ วันทนีย์ (2545) ได้รายงานไว้ว่า พันธุ์ UT3 ให้ค่าปฏิกิริยาอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวเน่าแดง

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูอ้อยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ในการใช้สารชีวภัณฑ์ในการป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาวอ้อยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต สามารถลดความเสียหายของผลผลิตอ้อยที่เกิดจากการเข้าทำลายของด้วงหนวดยาวอ้อย เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย สารชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย คือ เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ DOA-M14 อัตรา 10 กก./ไร่ และไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* อัตรา 75 กรัม/น้ำ 20 ลิตร การศึกษาประชากรของจักจั่นอ้อยและปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดในพื้นที่ปลูกอ้อยของเกษตรกร 5 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และกาญจนบุรี ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนตุลาคม 2565 พบจักจั่นอ้อยใน 3 จังหวัด ได้แก่ จ.สิงห์บุรี จ.อ่างทอง และจ.กาญจนบุรี ซึ่ง จ.สิงห์บุรี พบระยะไข่และตัวเต็มวัยในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม และระยะตัวอ่อนในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม ส่วน จ.อ่างทอง และจ.กาญจนบุรี พบเฉพาะตัวเต็มวัยในเดือนเมษายนและเดือนพฤษภาคม ตามลำดับ สำหรับ จ.สุพรรณบุรี และจ.ชัยนาท ไม่พบจักจั่นอ้อย การศึกษาชีววิทยาของจักจั่นอ้อย ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่ม บริเวณภายในเนื้อเยื่อเส้นกลางใบอ้อย ไข่มีลักษณะยาวรี เมื่อวางใหม่มีสีขาวขุ่น เริ่มใสและมีจุดสีแดง 2 จุด เมื่อใกล้ฟัก ระยะตัวอ่อนอาศัยอยู่ในดินบริเวณรอบและใต้รากอ้อย โดยขุดดินเป็นรูยาว

อาศัยภายในรู เมื่อใกล้ฟักเป็นตัวเต็มวัยจะเคลื่อนย้ายจากรูใต้ดินขึ้นมาบริเวณผิวดินเพื่อลอกคราบ ลักษณะของตัวอ่อน ส่วนหัว หนวด ออก ท้อง และขา เมื่อฟักใหม่มีลักษณะสีแดงใส หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น เมื่อใกล้ลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยตาจะมีสีแดง ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่บริเวณใบและยอดอ้อย ลักษณะของตัวเต็มวัย ส่วนหัว ขา สีน้ำตาล ตาสีแดง ออกสีน้ำตาลสลับแถบเหลือง และปีกสีน้ำตาลเหลือง และการประเมินความเสียหายของอ้อยจากการเข้าทำลายของจักจั่นอ้อย ได้เก็บรวบรวมจักจั่นอ้อยในพื้นที่ระบาดของจังหวัดสุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และกาญจนบุรี และเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณจักจั่นอ้อยให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการทดลองต่อไป

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูปาล์มน้ำมัน

การป้องกันกำจัดโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมันจากเชื้อสาเหตุ *Ganoderma* sp. สำรองและศึกษาพื้นฐานวิทยาของเชื้อรา *Ganoderma* spp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ganoderma* spp. จากพื้นที่ระบาด 6 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกระบี่ (21 ไร่/เฮกตาร์) จังหวัดตรัง (2 ไร่/เฮกตาร์) จังหวัดนครศรีธรรมราช (6 ไร่/เฮกตาร์) จังหวัดสุราษฎร์ธานี (10 ไร่/เฮกตาร์) จังหวัดชุมพร (1 ไร่/เฮกตาร์) และจังหวัดปทุมธานี (1 ไร่/เฮกตาร์) รวมทั้งสิ้น 41 ไร่/เฮกตาร์ โดยสามารถพบการเกิดเชื้อรา *Ganoderma* spp. ได้ทั้งในปาล์มน้ำมันรอบที่ 1 อายุในช่วง 10-30 ปี แปลงปาล์มน้ำมันที่เคยเป็นแปลงมะพร้าว และแปลงส้ม จากการสำรวจยังพบว่าแปลงปาล์มน้ำมันที่ปล่อยต้นรอบที่ 1 ยืนต้นตายภายในแปลงเป็นแหล่งสะสมเชื้อ (source inoculum) โดยส่วนใหญ่พบเชื้อรา *Ganoderma* spp. เข้าทำลายอยู่ ซึ่งอาจระบาดไปสู่ต้นปาล์มน้ำมันในรอบที่ 2 ได้ลักษณะดอกเห็ดของเชื้อรา *Ganoderma* spp. ที่ได้จากการสำรวจแบ่งออกเป็น 4 ลักษณะจากรูปร่างของดอก คือ รูปร่างใบพัดมีก้านดอก (11 ไร่/เฮกตาร์) รูปร่างใบพัดไม่มีก้านดอก (15 ไร่/เฮกตาร์) รูปร่างก้อนกลมมีก้านดอก (5 ไร่/เฮกตาร์) และรูปร่างก้อนกลมไม่มีก้านดอก (10 ไร่/เฮกตาร์) สีนน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม พบทั้งมีและไม่มีขอบสีขาว เมื่อแยกเชื้อรา *Ganoderma* spp. บนอาหาร PDA พบลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ด้านหลังโคโลนีพบการเจริญของเส้นใยฝังลงในอาหาร PDA จนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดรอยแตกได้อย่างชัดเจน โดยโคโลนีมีอัตราการเจริญเติบโตบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ขนาด 9 ซม. เฉลี่ย 10 วัน และเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบการสร้าง Clamp connection การศึกษาเทคนิคการปลูกเชื้อ *Ganoderma* sp. และอายุของต้นกล้าปาล์มน้ำมันที่ใช้ในการปลูกเชื้อ *Ganoderma* sp. สาเหตุโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน การเตรียมก้อนเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองควรเตรียมก่อนที่มีขนาดใหญ่ไล่มาขนาดเล็กเพื่อให้เชื้อเจริญเต็มก่อน และใช้ในการปลูกเชื้อพร้อมกัน การศึกษาวิธีการป้องกันโรคลำต้นเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Ganoderma* sp. ของปาล์มน้ำมันในการปลูกปาล์มรอบใหม่ ปลูกต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 12 เดือนตามขนาดหลุม และอยู่ระหว่างการสังเกตอาการของต้นกล้าเพื่อเก็บข้อมูลต่อไป การประเมินลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันลูกผสมสุราษฎร์ธานีโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลยีน EgIFR (isoflavone reductase-like protein) และ EgMT-1 (metallothionein-like protein) เป็นยีนที่บ่งชี้ถึงลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน โดยไพรเมอร์ของยีน EgIFR คือ EgIFR_F (AAGCTCCTGGACGACTTCAA) EgIFR_R (ATGGGAGGAAGTAACCAGCA) และไพรเมอร์ของยีน EgMT-1 คือ EgMT-1_F (AGGCAAATGTG GCTGTGGCGTT) EgMT-1_R (ACTTGACAGTTGCAGCCTCCGTT) สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน ส่วนการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่สัมพันธ์กับลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน ตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์อ่อนแอและทนทานต่อโรคลำต้นเน่ามีจำนวน reads เท่ากับ 56195866 และ 43211538 bp ตามลำดับ การระบุยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสองตัวอย่าง (Differently expressed genes; DEGs) พบว่า มีจำนวน Contig และ Unigene เท่ากับ

7305620 และ 158028 sequences ตามลำดับ จำนวนยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันจากข้อมูลทรานสคริปโตมบนิโอมของปาล์มน้ำมันทั้ง 3 ตัวอย่างที่ถูกจัดเป็น 2 ชุดข้อมูลคือ ชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์อ่อนแอต่อโรคลำต้นเน่า และชุดควบคุมสายพันธุ์การค้า/สายพันธุ์ทนทานต่อโรคลำต้นเน่า มีการแสดงออกของยีน 3370 และ 2751 ยีน ตามลำดับ และมียีนที่มีการแสดงออกเหมือนกัน 934 ยีน การวิเคราะห์ Gene ontology เพื่อค้นหาความสัมพันธ์ของกลุ่มยีนที่ได้จากการแสดงออกของยีนโดยการวิเคราะห์ KEGG pathway พบว่า กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุด 5 กลุ่มแรกประกอบด้วย Ribosome, Ribosome biogenesis in eukaryotes, Plant hormone signal transduction, RNA transport และ Protein processing in endoplasmic reticulum ซึ่งกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกมากที่สุดดังกล่าวน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน โดยจะใช้ในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลต่อไป ซึ่งการศึกษาการใช้ *Streptomyces* sp. ในการควบคุมโรคลำต้นเน่าของต้นกล้าปาล์มน้ำมันอายุ 3-5 เดือน จากการศึกษาวัสดุที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณจำนวนสปอร์ของ *Streptomyces* sp. ในวัสดุทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย เมล็ดข้าวโพด ข้าวโพดเกล็ด เมล็ดข้าวฟ่าง และเมล็ดข้าวเปลือก โดยเลี้ยง *Streptomyces* sp. ในวัสดุทั้ง 4 ชนิด เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ข้าวโพดเกล็ด สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *Streptomyces* sp. ได้ดีที่สุด โดยมีความหนาแน่นของจำนวนสปอร์เท่ากับ 2.29×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตต่อหน่วยของวัสดุแต่ละชนิด พบว่า เมล็ดข้าวฟ่าง มีราคาแพงที่สุด คือ 5.63 บาท รองลงมาคือ ข้าวโพดเกล็ด เมล็ดข้าวโพด และเมล็ดข้าวเปลือกมีราคาใกล้เคียงกัน คือ 1.80-1.94 บาท ดังนั้นข้าวโพดเกล็ดจึงเป็นวัสดุที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของ *Streptomyces* sp. ในด้านการเพิ่มจำนวนของสปอร์และต้นทุนการผลิตต่อหน่วย

การป้องกันกำจัดหนอนหน้าแมวและหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมัน ทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีด้วยการฉีดเข้าลำต้นเพื่อป้องกันกำจัดหนอนหน้าแมวในปาล์มน้ำมัน อยู่ระหว่างเฝ้าติดตามการระบาดของหนอนหน้าแมวในแปลงเกษตรกรรมอำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ในรอบถัดไป เพื่อทำการทดลองฉีดสารเข้าลำต้น และทดสอบประสิทธิภาพสารเคมีด้วยการฉีดเข้าลำต้นเพื่อป้องกันกำจัดหนอนปลอกเล็กในปาล์มน้ำมันหลังฉีดสารเคมีเข้าลำต้น อยู่ระหว่างเก็บข้อมูลหลังฉีดสารเคมี 90 วัน

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

จากข้อมูลการทดลองในการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีต่อกิ่ง พบว่าไม่สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Nested PCR ได้ เนื่องจากมีปริมาณเชื้อต่ำหรือไม่สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีดังกล่าวได้ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเพิ่มวิธีการถ่ายทอดโรคโดยการใช้ต้นฝอยทองมาทำการถ่ายทอดเชื้อเพิ่มเติมให้ผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐาน และมีแนวทางการใช้เทคนิค Real time PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาต่อไป

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

ไม่มี

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2545. เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับอ้อย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์สหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 26 หน้า.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2563. รายงานสถานการณ์ศัตรูพืชไร่. <http://www.ppsf.doae.go.th>. สืบค้นวันที่ 20 กรกฎาคม 2563.
- เกศสุดา สนศิริ และ วารีย์ หงษ์พฤกษ์. 2559. จักจั่น *Platypleura cespiticola* Boulard (Hemiptera: Cicadidae: Cicadinae) แมลงศัตรูอ้อยที่ควรเฝ้าระวัง. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา ปีที่ 34 ฉบับที่ 1.
- ชนินทร ดวงสะอาด พรพิมล อธิปัญญาคม และ สุณิรัตน์ สิมะเต็อ. 2555. การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี. หน้า 94-106. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- ณัฐกฤต พิทักษ์ และอนุวัฒน์ จันทรสวรรณ. 2544. แมลงศัตรูอ้อยโรงงาน อ้อยเคี้ยว อ้อยค้ำน้ำ และการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการ กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่นๆ กองกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 102 หน้า.
- ณัฐกฤต พิทักษ์ อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ ดารารัตน์ มณีจันทร์ ดุจดดา พิมรัตน์ และสุรรัตน์ ทองคำ. 2558. แมลงศัตรูอ้อยโรงงาน อ้อยเคี้ยว อ้อยค้ำน้ำ และการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 94 หน้า.
- ณัฐกฤต พิทักษ์. 2548. ใช้เชื้อราควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย. กสิกร 78(2): 23-25.
- ณัฐกฤต พิทักษ์. 2550. การควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย. กสิกร 80(5): 80-82.
- ณัฐกฤต พิทักษ์และ อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ 2555. ด้วงหนวดยาวอ้อยและการป้องกันกำจัด. สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร. (แผ่นพับ)
- ทวีศักดิ์ ชัยภาส. (2544). แมลงศัตรูปาล์มน้ำมันในประเทศไทย: เอกสารวิชาการ. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร กองกสิกรรมและสัตววิทยา กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูพืชสวนอุตสาหกรรม
- นิรนาม. 2563. อ้อย. <http://www.wikipedia.org/wiki/อ้อย>. สืบค้นวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2563.
- ประพิศ วองเทียม จงรักษ์ จารุเนตร และศุภชัย สารกาญจน์. 2553. การจำแนกและประเมินระดับความต้านทานแมลงศัตรูของเชื้อพันธุ์น้ำมันสำปะหลัง. ผลงานวิจัยฉบับเต็ม ใน เอกสารขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร.
- ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ พงศกร สรรค์วิทยากุล ปิยนุช ศรชัย และ จิตติรัตน์ อัครวมงคลศิริ. 2563. การตรวจสอบข้าวโพดตัดแปรพันธุ์กรรมสายพันธุ์ MON810 และ NK603 ด้วยเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP). ใน รายงานโครงการวิจัยพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืชตัดแปรพันธุ์กรรม. กรมวิชาการเกษตร 2563, 53 – 69 หน้า.
- พรพิมล อธิปัญญาคม ชนินทร ดวงสะอาด และ สุณิรัตน์ สิมะเต็อ. 2556. การควบคุมโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันโดยชีววิธี หน้า 97-114. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

- พลอยชมพู กรวิภาสเรือง มานิตา คงชื่นสิน พิเชฐ เซาว์นวัฒนวงศ์ วิมลวรรณ โชติวงศ์ และอัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล. 2558. อนุกรมวิธาน และเขตแพร่กระจายของไรศัตรูมันสำปะหลังในประเทศไทย. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 90-128.
- พิเชฐ เซาว์นวัฒนวงศ์ พงษ์ชาติ ปุณย์วิทย์ พิชัยวรรณ จงจิตเมตต์ สุนัดดา เชาวลิต จอมสุรางค์ ดวงอิสาร นลินา ไชยสิงห์ สุชาดา สุพรศิลป์ วรวิช สุดจริตธรรมจริยางกูร ลมัย ชูเกียรติวัฒนา วาเลนไทน์ เจือสกุล ชนิตา ทองแถม วีระสิงห์ แสงวรรณ วิชชุดา ควรหัตร์ สุวัฒน์ พูลพาน.โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการป้องกันกำจัด หนอนหัวดำมะพร้าวแบบบูรณาการ.รายงานผลวิจัย ปี 2564. กรมวิชาการเกษตร.
- วรกร สิทธิพงษ์, ธีระ ชูแก้ว, และเทิดศักดิ์ สวัสดิ์สุข. (2564). โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน. ข่าวสารปาล์มน้ำมัน (ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี), 39 (1), หน้า 8-12.
- วัฒนา จารณศรี มานิตา คงชื่นสิน เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เซาว์นวัฒนวงศ์. 2544. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. เอกสารวิชาการของกองกีฏและสัตววิทยา ปี พ.ศ. 2544. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 192 หน้า.
- วันทนีย์ อู่วานิชย์. 2545. เอกสารวิชาการ โรคอ้อยสำคัญที่เกิดจากเชื้อรา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 78 หน้า.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2536. โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในประเทศไทย หน้า 205-209 ใน : การอบรมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการพัฒนาเพื่อเพิ่มเทคโนโลยีการวิจัยและการผลิตมะพร้าว โกโก้ ปาล์มน้ำมัน ประจำปี 2536. ณ โรงแรมแมนฮัตตันพาลาเลซ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2536. โรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมันในประเทศไทย หน้า 205-209 ใน : การอบรมสัมมนาเชิงปฏิบัติการการพัฒนาเพื่อเพิ่มเทคโนโลยีการวิจัยและการผลิตมะพร้าว โกโก้ ปาล์มน้ำมัน ประจำปี 2536. ณ โรงแรมแมนฮัตตันพาลาเลซ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.
- ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช. 2547. โรคปาล์มน้ำมัน, เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 74-141.
- ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี. (ไม่ระบุปีที่พิมพ์). การป้องกันกำจัดด้วงหนวดยาวอ้อยโดยวิธีผสมผสาน. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร. (แผ่นพับ)
- สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. 2559. สถานการณ์การระบาดของจักจั่นและด้วงหนวดยาวอ้อย. ใน เอกสารประกอบการสัมมนา ยุทธศาสตร์งานวิจัย: ก้าวต่อไปกับพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ระหว่างวันที่ 24-26 สิงหาคม 2559 ณ แพนตาซีรีสอร์ท อำเภอเมือง จังหวัดชัยนาท สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2563. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย ปลูกผลิต 2561/62. <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9040.pdf>. สืบค้นวันที่ 27 กุมภาพันธ์ 2563.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2563. ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร. <https://www.oae.go.th/view/1/ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร/TH-TH>. สืบค้นวันที่ 20 กรกฎาคม 2563.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. Product มันสำปะหลังโรงงาน [ออนไลน์]. 2564, แหล่งที่มา : <http://misapp.oae.go.th/product/มันสำปะหลังโรงงาน> ค้นเมื่อ 5 พฤษภาคม 2564.

- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2561. คู่มือการสำรวจและเฝ้าระวังโรคใบด่างมันสำปะหลัง. พิมพ์ครั้งที่ 3. 7 - 8 หน้า.
- สุภาพร กลิ่นคง วาสนา รุ่งสว่าง ปันथा ขวัญทองยิ้ม และคณิงนิตย์ เจริญวรารกร. 2559. การจัดจำแนกในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในโรคพุ่มแจ้ - โรคอุบัติใหม่ของมันสำปะหลังในประเทศไทย. ว. วิทย. กษ. 47(2):175-188.
- สุภาพร กลิ่นคง. 2552. ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- โสภิตา อิศรางกูร ณ อยุธยา ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และอำไพวรรณ ภราดรนวัฒน์. 2560. การตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในไม้ดอกไม้ประดับในประเทศไทย. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 13. 39-53.
- อรรรัตน์ วงศ์ศรี, เตือนจิตร เพ็ชรรุณ, และชญาดา ดวงวิเชียร. (2554). ชีววิทยาปาล์มน้ำมัน. เอกสารวิชาการ การเพิ่มประสิทธิภาพ การผลิตปาล์มน้ำมันอย่างถูกต้องและเหมาะสม. 2554 (1). หน้า 1-2
- อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล พิเชฐ ชาวน์วัฒนวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง และอหิติตยา แก้วประดิษฐ์. 2561. ชีววิทยาของไรแดงมันสำปะหลัง (Cassava Red Mite); *Oligonychus biharensis* (Hirst). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2561 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. หน้า 362-374.
- อัปสร เปลี่ยนสินไชย นิพนธ์ เอี่ยมสุภาชิต อุดม เลียบวัน วันทนา ตั้งเปรมศรี และวันทนีย์ อุ้วาณิชย์. 2535. การทดสอบปฏิกิริยาของสายพันธุ์อ้อยต่อโรคเหี่ยวเน่าแดง. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535. ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 9-21.
- Abdullah F., G.N.M. Ilias, M. Nelson, M.Z Nur Ain Iz-Zati and Y. Umi Kalsom. 2003. Disease assessment and the efficacy of Trichoderma as a bioagent of basal stem rot of oil palms. Research Bulletin Science Putra, 11: 31-33.
- Alvarez E., J.F. Mejia, G. A. Llano, J. B. Loke, A. Calari, B. Duduk and A. Bertaccini. 2009. Characterization of a Phytoplasma associated with frog skin disease in Cassava. *Plant Dis.*, 93:1139-1145.
- Alvarez E., J. M. Pardo and M. J. Truke. 2014. Detection and identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris'- related phytoplasma associated with a witches' broom disease of cassava in Cambodia. *Phytopath* 104:7-7.
- Alvarez E., J. M. Pardo, J. F. Mejia, A. Bertaccini, N. D. Thanh and X. H. Trinh. 2013. Detection and identification of 'Candidatus Phytoplasma asteris' - related phytoplasmas associated with a witches' broom disease of cassava in Vietnam. *Phytopathogenic Mollicutes* 3:77-81.
- Ariffin D., A.S. Idris and G. Singh. 2000. Status of *Ganoderma* Oil Palm. Pages 49-70. In : *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing.
- Arocha Y., B. Pinol, R. Almeida, K. Acosta, M. Quinones, T. Zayas, M. Varela, Y. Marrero, E. Boa and J. A. Lucas. 2009. First report of phytoplasmas affecting organoponic crops in central and eastern Cuba. *Plant Pathol*:793.

- Bellotti A.C. and K. Kawano. 1980. Breeding Approaches in Cassava. *In* : F.G. Maxwell and P.R. Jennings (eds.). Breeding Plants Resistant to Insects. Wiley, New York. pp. 314-335.
- Bharudin I., Ab Wahab AFF, Abd Samad MA, Xin Yie N, Zairun MA, Abu Bakar FD, Abdul Murad AM. Review Update on the Life Cycle, Plant-Microbe Interaction, Genomics, Detection and Control Strategies of the Oil Palm Pathogen *Ganoderma boninense*. *Biology (Basel)*. 2022 Feb 6;11(2):251. doi: 10.3390/biology11020251. PMID: 35205119; PMCID: PMC8869222.
- Bivi M. R., , M. S. N. Farhana, A. Khairulmazmi and A Idris. 2010. Control of *Ganoderma boninense*: a causal agent of basal stem rot disease in oil palm with endophyte bacteria *in vitro*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 12: 833-839.
- Christensen N. M., K. B. Axelsen, M. Nicolaisen and A. Schulz. 2005. Phytoplasma and their interaction with hosts. *Trends Plant Sci* 10: 526-535.
- Deng S.J. and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and nonculturable mollicutes. *J Microbiol Methods* 14:53-61.
- Doi Y., M. Teranaka, K. Yora and H. Asuyama. 1967. Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Jpn J Phytopathol* 33: 259-266.
- Ellis J.J. 1979. Preservative fungus strains in sterile water. *MYCOLOGIA*, Vol. 71. P.1072.
- Fernandez F., A. Uset, G. Baumgratz and L. Conci. 2018. Detection and identification of a 16SrIII-J phytoplasma affecting cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Argentina. *Australas Plant Dis Notes* 13:24.
- Flood J., Y. Hasan, P.D. Turner, E.B. O'Grady. 2000. The spread of *Ganoderma* from infective sources in the field and its implications for management of the disease in oil palm. *In*: Flood J, Bridge PD, Holderness M, eds. *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 101-12.
- Flores D., I.C. Haas, M.C. Canale and I.P. Bedendo. 2013. Molecular identification of a 16SrIII-B phytoplasma associated with cassava witches' broom disease. *Eur J. Plant Pathol* 137:237-242.
- Fong Y.K., S. Anuar, H.P. Lim, F.Y. Tham and F.R. Sanderson. 2000. A modified filter paper technique for long-term preservation of some fungal cultures. *Mycologist* 14(3):128-131.
- Forbes B. A., D.F. Sahm and A.S. Weissfeld. 2002. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 11th ed. Missouri: Mosby, Inc.
- Gundersen-Rindal D. E. and Lee I-M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. Medit.*, 35: 144-151.

- Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, and P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *Journal of Economic Entomology*. 99: 1531–1537.
- Hasan Y. and P.D. Turner. 1998. The comparative importance of different basal tissue as infection sources for basal stem rot in replanting. *The Planter* 74, 119–35
- Ian A.H. 2017. The mycology of the Basidiomycetes. Heart rot and root rot in tropical Acacia plantations. Proceedings of a workshop held in Yogyakarta, Indonesia, 7–9 February 2006. Canberra, ACIAR Proceedings No. 124.
- Idris A., A. Kushairi, S. Ismail and D. Ariffin. 2004. Selection for partial resistance in oil palm progenies to *Ganoderma* basal stem rot. *J Oil Palm Res.* 16 (2): 12-18.
- Ishii T., Y. Doi, K. Yora and H. Asuyama. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Jpn J Phytopathol* 33: 267-275.
- Kaewmanee C. and Y. Hanboonsong. 2011. Evaluatyon of efficiency of various treatments used for sugarcane white leaf phytoplasma control. *Bull Insectol* 64: S197-S198.
- Kakizawa S., K. Oshima, Y. Ishii, A. Hoshi, K. Maejima, H-Y Jung, Y. Yamaji and S. Namba. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiol Lett* 293:92–101.
- Kamarudin N. 2017. Controlling *Metisa plana* Walker (Lepidoptera: Psychidae) outbreak using *Bacillus thuringiensis* at an oil palm plantation in slim river, Perak, Malaysia, *Journal of Oil Palm Research* Vol. 29 (1) March 2017. p 47-57.
- Koinuma H., A. Miyazaki, R. Wakaki, Y. Fujimoto, N. Iwabuchi, T. Nijo, Y. Kitazawa, T. Shigaki, K. Maejima, Y. Yamaji and S. Namba. 2018. First report of 'Candidatus Phytoplasma pruni' infecting cassava in Japan *J. of Gen Plant Pathol* 84 :300-304.
- Kongchuensin M., V. Charanasri and A. Takafuji. 2005. Geographic distribution of *Neoseiulus longispinosus* (Evans) and its habitat plants in Thailand. *Acarology Society of Japan*. 14(1):1-11.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-185.
- Limpanavech P., S. Chaiyasuta, R. Vongpromek, R. Pichyangkura, C. Khunwasi, S. Chadchawan, P. Lutrakul, R. Bunjongrat, A. Chaidee and T. Bangyeekhun. 2006. Chitosan effects on floral production, gene expression and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *J. Scientia Horticulture*. 116: 65-72.

- Masri M. 2021. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* aerial spraying against the bagworm, *Metisa plana* Walker (Lepidoptera: Psychidae) outbreak in oil palm using drone. *Journal of Oil Palm Research*. 13 p.
- McCoy R.E. 1982. Use of tetracycline antibiotics to control yellows disease. *Plant Dis* 66: 539-542.
- McGonigle T.P., M.H. Miller, D.G. Evans, G.L.Fairchild, and J.A.Swan. 1990. A new method which gives an objective of colonization of root by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 115: 495- 501.
- Mohamad H., Z.Z. Zin and A.H. Halim. 1985. Potentials of oil palm by-products as raw materials for agro-based industries. Pages 7-15. *In: Proceedings of the National Symposium on Oil Palm By-Products for Agro-Based Industries*. Palm Oil Research Institute of Malaysia, Kuala Lumpur.
- Moonjuntha P., P. Maneechoat, N. Kositcharoenkul, P. Wongtiem and K.T. Natsuaki. 2018. Detection and classification of *Candidatus* Phytoplasma associated with cassava witches' broom disease in Thailand .*In International Congress of Plant Pathology (ICPP) (2018 :Plant Health in A Global Economy, Boston Massachusetts, U.S.A .July 29 -August 3, 2018*.
- Moonjuntha P., Y. Nakamura, V.C. Tran, H. N. Hy, X. H. Trinh and K.T. Natsuaki. 2019. Detection of 'Ca .Phytoplasma australasia 'related strain in cassava witches' broom disease in Vietnam . *In The 2019 Meeting of Kanto Division of the Phytopathological Society of Japan at The University of Tokyo, Tokyo Japan, September 19 - 20, 2019*.
- Moonjuntha P., K. Pao,K. Sophary and K.T. Natsuaki. 2019a. First report of 'Ca. Phytoplasma aurantifolia' related phytoplasma associated with cassava witches' broom disease in Cambodia. *In The 2019 Annual Meeting of the Phytopathological Society of Japan at Tsukuba International Conference Center, Ibaraki Japan, March 18 – 20, 2019*.
- Mutisya D.L., C.P.M. Khamala, E.M. El Banhawy, C.W. Kariuki, and D.W. Miano. 2014. Determination of damage threshold of cassava green mite (Acari :Tetranychidae) on different cassava varieties. *Journal of plant and pest science*. 1(2): 79-86.
- Notomi T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa and K. Watanabe. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 28(12): 63.
- Nur Ain Izzati M.Z. and F. Abdullah. 2008. Disease suppression in Ganoderma-infected oil palm seeding treated with *Trichoderma harzium*. *Plant Protec. Sci*. 44:101-107.
- Pinili S. M., A. S. Langres, M.Y. Retuta, C.E. Ledesma, L. A. Alcachupa, P. J. A. Pia, M. L. Dolores, P. Moonjuntha and K. T. Natsuaki. 2019. 'Candidatus Phytoplasma luffae' 16Sr-VIII-A AND related strain are associated with the cassava witches' broom disease in the Philippines. *In ISSAAS 2019 International Congress & General Meeting at Universiti Putra Malaysia, Selangor Malaysia. October 18 -20, 2019*.

- Putranto, R.A., I. Syaputra and A. Budiani. 2016. Differential gene expression in oil palm varieties susceptible and tolerant to Ganoderma. Proceeding The 6th Indonesian Biotechnology Conference Surakarta, 233-243.
- Schneider B., E. Seemueller, C.D. Smart and B.C. Kirkpatrick. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG (eds) Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology. Academic, San Diego, pp 369–380.
- Shivas R. and D. Beasley. 2005. Management of Plant pathogen Collections. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, Australia. 82 pp.
- Smith D. and A.H.S. Onions. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2nd Edition. IMI Technical Handbook No.2. International Mycological institute, CAB International. 122 p.
- Sugawara K., M. Himeno, T. Keima, Y. Kitazawa, K. Maejima, K. Oshima and S. Namba. 2012. Rapid and reliable detection of phytoplasma by loopmediated isothermal amplification targeting a housekeeping gene. *J General Plant Pathol* 78 (6):389–397.
- Sutton B. C. 1980. *The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute , Kew, Surrey, England.
- Tan Y.C., K.A. Yeoh, M.Y. Wong and C.L. Ho. 2013. Expression profiles of putative defence-related proteins in oil palm (*Elaeis guineensis*) colonised by *Ganoderma boninense*. *J. Plant Physiol.* 170: 1455-1460.
- Tanno K., K. Maejima, A. Miyazaki, H. Koinuma, N. Iwabuchi, Y. Kitazawa, T. Nijo, M. Hashomot., Y. Yamaji and S. Namba. 2018. Comprehensive screening of antimicrobials to control phytoplasma disease using in vitro plant-phytoplasma co-culture system. *Microbiol* 164 (8): 1048-1058.
- Tomlinson J.A., N. Boonham and M. Dickinson. 2010. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathol* 59 (3): 465–471.
- Turner P.D. 1981. Oil Palm Diseases and Disorders. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Virdiana I., J. Flood, B. Sitepu, Y. Hasan, R. Aditya and S. Nelson. 2012. Integrated disease management to reduce future Ganoderma infection during oil palm replanting. *The Planter* 88, 383–95. *Plant Pathology* (2018)67, 1841–1849 Basidiospores as sources of inoculum 1849.
- Vu N.T., J.M. Pardo, E. Alvarez, H.H. Le, K. Wyckhuys, K-L. Nguyen and D.T. Le. 2016. Establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of phytoplasma-associated cassava witches' broom disease. *Appl Biol Chem* 59(2): 151–156.

- Zamharir M.G. 2011. Phytoplasma associated with almond witches broom disease. An overview. *Afr J Microbiol Res* 5: 6013-6017
- Zuhar, L.M., A.Z. Madihah., S.A. Ahmad., Z. Zainal., A.S. Idris and N.A. Shaharuddin. 2021. Identification of oil palm's consistently upregulated genes during early infections of *Ganoderma boninense* via RNA-seq technology and real-time quantitative PCR. *Plants* (Basel). 10: 1-17.

กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1 สิ่งแสดงประกอบเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับเนื้อหาผลงานวิจัย

ภาคผนวก 2 หลักฐานเชิงประจักษ์ของผลผลิตที่ได้

ภาคผนวก 2.1 เทคโนโลยี/กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 7 กระบวนการใหม่

หลักฐานที่ 1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะและความไวของไพรเมอร์ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค multiplex PCR จากการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบจากยีนเป้าหมายบริเวณ 16S-23S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ่งในมันสำปะหลัง จำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่ 16Srl group และ 16SrlI group ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวน 2 คู่ ได้แก่

- คู่ที่ 1 cwbf1 (5'-TATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACA-3')
cwbR1 (5'-TTTACCACTACACATGGAATTCCAATTGCC-3')
- คู่ที่ 2 cwbf2 (5'-TTTACCACTACACATGGAATTCCAATTGCC-3')
cwbR2 (5'-TGCTGGCACATAATTAGCCGGGGCTTATTCATC-3')

nested PCR สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดที่ความเข้มข้นที่ 10^{-6} ส่วน multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-8}

หลักฐานที่ 2 ไพรเมอร์ที่จำเพาะและความไวของไพรเมอร์ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP

```
AGGAACACCACTAGCGAAGGCGGCTTGCTGGGTCTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAAGTGTG
AAGTTAACACATTAAGTACCTCCGCTGAGTAGTACGTACGGCAAGTATGAAACTTAAGGAATTGACGGGA
CTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATG
CTTCTGCAAACTGTAGAAACACAGTGGAGGTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCATTATTGTTAGTTGCCAGCAGTAATGG
TGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAGGGTAGCTGAAACGCAAGTTTTTGGCGA
```

ไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน Cassava witches'-broom phytoplasma

ผลการทดสอบหาความจำเพาะในการตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาโรคพุ่มแฉ่งในมันสำปะหลังโดยเปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะเชื้อไฟโตพลาสมาโรคพุ่มแฉ่งในมันสำปะหลัง โดยไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย และพบว่าเทคนิคแลมป์มีความไวมากกว่าเทคนิค nested PCR ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา

หลักฐานที่ 3 ชนิดของสารปฏิชีวนะและค่าความเข้มข้นในระดับเบื้องต้นที่สามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

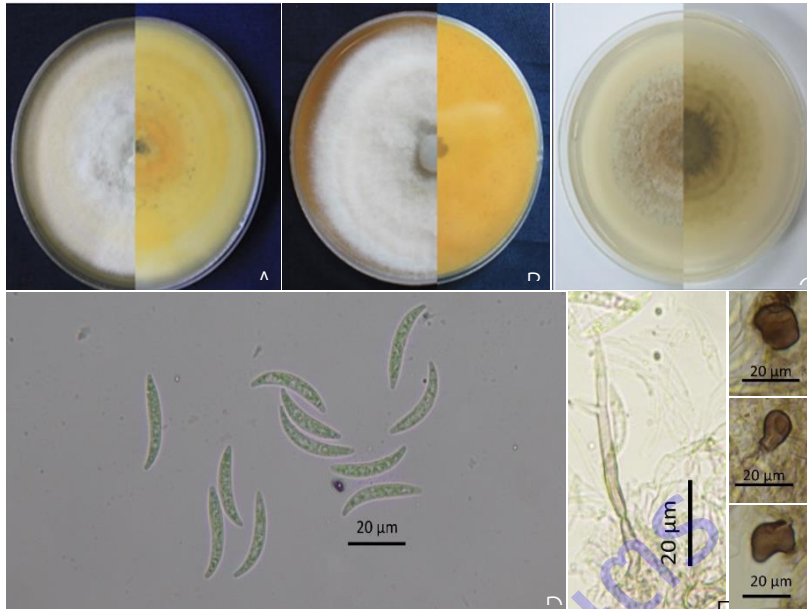
การยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยสารปฏิชีวนะจำนวน 2 ชนิดได้แก่ เตตระไซคลิน และโรแฟมพิซิน ที่เข้มข้น 0 50 และ 100 ppm พบว่าทั้งสองความเข้มข้นสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้น 50 ppm มาทดสอบการยับยั้งต่อในปีที่ 2



ต้นมันสำปะหลังเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่ผสมสารปฏิชีวนะทั้งสองชนิด

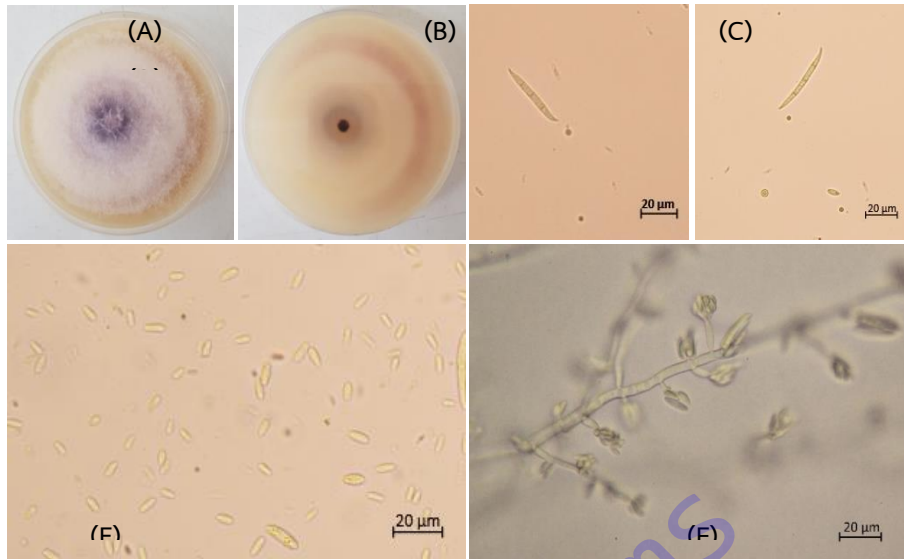
หลักฐานที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดง

เชื้อรา *Colletotrichum falcatum* สามารถเจริญเติบโตได้ดีบนอาหาร OMA ที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคลนีสีสีขาว เทา และเทาเข้มถึงดำ สร้างกลุ่มสปอร์สีส้มจำนวนมาก สร้างสปอร์เซลล์เดี่ยว รูปร่างโค้ง (falcate) ขนาด 20-30 x 4-5 ไมโครเมตร สร้างแอฟเพรสซอเรีย ขนาด 9-13 x 11-12 ไมโครเมตร สร้าง seta ขนาด 100-300 x 4-9 ไมโครเมตร



ลักษณะเชื้อรา *C. falcatum* บนอาหาร (A) OMA (B) MEA และ (C) PDA อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (D) conidia (E) seta และ (F-H) appressoria

สำหรับเชื้อรา *Fusarium moniliforme* หรือปัจจุบันคือ *Fusarium verticillioides* (Sacc.) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าโคโคนีของเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เส้นใยมีลักษณะฟูละเอียด โคลนมีสีขาว อมชมพูถึงม่วง เชื้อสร้างเส้นใยแบบมีผนังกัน รูปร่าง macroconidia ยาวเรียวโค้งหรือเกือบตรง มี 3-5 septate หรืออาจมากกว่านั้น ขนาด 3.2-3.7 x 32.7- 43.5 ไมโครเมตร apical cell โค้งเล็กน้อยปลายเรียว พบจำนวนน้อย microconidia เซลล์เดี่ยว รูปร่างคล้ายกระบอง (clavate) หรือรูปไข่ (oval) ขนาด 2.3-2.6 x 5.9-7.3 ไมโครเมตร ถูกสร้างจำนวนมาก เกิดแบบกลุ่ม (false heads) หรือเรียงต่อกันเป็นโซ่ (chains) บน phialide บนปลายก้าน conidiophore พบน้อยที่เกิดจาก phialide ที่เจริญจากเส้นใยโดยตรง



ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Fusarium* sp. (A, B) โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (C,D) ลักษณะ macroconidia (E) ลักษณะ microconidia และ (F) ลักษณะของ microconidia ที่เจริญแบบกลุ่ม (false heads) บน phialide

หลักฐานที่ 5 ข้อมูลประชากรของจักจั่นและศัตรูธรรมชาติ

การศึกษาประชากรของจักจั่นอ้อยและปัจจัยที่มีผลต่อการระบาดในพื้นที่ปลูกอ้อยของเกษตรกร 5 จังหวัด ได้แก่ สุพรรณบุรี อ่างทอง สิงห์บุรี ชัยนาท และกาญจนบุรี ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนตุลาคม 2565 พบจักจั่นอ้อยใน 3 จังหวัด ได้แก่ จ.สิงห์บุรี จ.อ่างทอง และจ.กาญจนบุรี ซึ่ง จ.สิงห์บุรี พบระยะไข่และตัวเต็มวัยในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม และระยะตัวอ่อนในช่วงเดือนสิงหาคม-ตุลาคม ส่วน จ.อ่างทอง และจ.กาญจนบุรี พบเฉพาะตัวเต็มวัยในเดือนเมษายนและเดือนพฤษภาคม ตามลำดับ สำหรับ จ.สุพรรณบุรี และจ.ชัยนาท ไม่พบจักจั่นอ้อย (ตารางที่ 1-5)

ตารางที่ 1 ปริมาณจักจั่นอ้อย ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และ pH ในแปลงอ้อยเกษตรกร จ.สุพรรณบุรี ในช่วงเดือนมกราคม-ตุลาคม 2565

เดือน	จำนวนจักจั่นอ้อย (ตัว)			อุณหภูมิ (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)		pH
	กลุ่มไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ดิน	อากาศ	ดิน	อากาศ	
ม.ค.	0	0	0	32.58	36.93	67.00	33.80	6.95
ก.พ.	0	0	0	30.17	31.75	74.75	44.18	6.10
มี.ค.	0	0	0	31.83	34.70	76.08	56.98	7
เม.ย.	0	0	0	34.93	37.73	78.48	50.55	7
พ.ค.	0	0	0	34.80	35.88	76.40	57.95	7
มิ.ย.	0	0	0	33.85	37.85	83.00	51.80	7
ก.ค.	0	0	0	31.35	33.30	82.15	66.80	7
ส.ค.	0	0	0	31.53	32.23	80.08	68.70	7
ก.ย.	0	0	0	32.37	34.68	81.77	63.55	7
ต.ค.	0	0	0	32.30	33.58	64.20	58.65	7
เฉลี่ย	0	0	0	32.57	34.86	76.39	55.30	6.91

ตารางที่ 2 ปริมาณจักจั่นอ้อย ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และ pH ในแปลงอ้อยเกษตรกร จ.อ่างทอง ในช่วงเดือนมกราคม-ตุลาคม 2565

เดือน	จำนวนจักจั่นอ้อย (ตัว)			อุณหภูมิ (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)		pH
	กลุ่มไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ดิน	อากาศ	ดิน	อากาศ	
ม.ค.	0	0	0	30.43	36.33	70.85	51.23	6.90
ก.พ.	0	0	0	26.88	29.18	66.88	38.53	6.58
มี.ค.	0	0	0	32.05	36.25	72.85	51.15	7
เม.ย.	0	0	0.2	35.05	39.53	73.50	49.20	7
พ.ค.	0	0	0	34.48	35.55	72.25	55.13	7
มิ.ย.	0	0	0	33.53	36.90	77.50	50.55	7
ก.ค.	0	0	0	30.40	33.58	82.65	66.05	7
ส.ค.	0	0	0	31.88	37.98	85.43	58.75	7
ก.ย.	0	0	0	31.00	35.63	79.20	60.50	7
ต.ค.	0	0	0	31.40	34.00	80.08	60.65	7
เฉลี่ย	0	0	0.02	31.71	35.49	76.12	54.17	6.95

ตารางที่ 3 ปริมาณจักจั่นอ้อย ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และ pH ในแปลงอ้อยเกษตรกร จ.สิงห์บุรี ในช่วงเดือนมกราคม-ตุลาคม 2565

เดือน	จำนวนจักจั่นอ้อย (ตัว)			อุณหภูมิ (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)		pH
	กลุ่มไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ดิน	อากาศ	ดิน	อากาศ	
ม.ค.	0	0	0	29.70	34.38	71.43	45.08	6.70
ก.พ.	0	0	0	30.53	33.08	72.15	41.60	6.68
มี.ค.	0	0	0	32.65	37.43	72.08	49.23	7
เม.ย.	0	0	0	35.63	40.08	76.58	42.73	7
พ.ค.	0.68	0	0.85	32.63	36.48	75.08	50.28	7
มิ.ย.	0.90	0	0.90	34.38	34.88	79.50	59.83	7
ก.ค.	0.18	0	0.10	32.83	34.43	83.25	63.25	7
ส.ค.	0	0.33	0	31.03	35.98	75.15	58.20	7
ก.ย.	0	0.55	0	31.88	33.85	77.58	59.38	7
ต.ค.	0	0.45	0	31.70	33.65	81.15	60.63	7
เฉลี่ย	0.18	0.13	0.19	32.29	35.42	76.39	53.02	6.94

ตารางที่ 4 ปริมาณจักจั่นอ้อย ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และ pH ในแปลงอ้อยเกษตรกร จ.ชัยนาท ในช่วงเดือนมกราคม-ตุลาคม 2565

เดือน	จำนวนจักจั่นอ้อย (ตัว)			อุณหภูมิ (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)		pH
	กลุ่มไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ดิน	อากาศ	ดิน	อากาศ	
ม.ค.	0	0	0	28.45	35.30	73.58	40.83	7.38
ก.พ.	0	0	0	29.13	30.60	72.13	45.28	6.93
มี.ค.	0	0	0	31.75	36.15	75.75	54.58	7.05
เม.ย.	0	0	0	35.10	38.95	75.33	53.85	7
พ.ค.	0	0	0	32.75	35.20	73.33	59.10	7
มิ.ย.	0	0	0	32.83	35.58	81.33	57.98	7
ก.ค.	0	0	0	31.33	34.30	83.25	66.05	7
ส.ค.	0	0	0	30.03	30.73	85.58	82.15	7
ก.ย.	0	0	0	32.47	35.43	82.17	55.75	7
ต.ค.	0	0	0	31.85	33.78	81.95	53.50	7
เฉลี่ย	0	0	0	31.57	34.60	78.44	56.91	7.04

ตารางที่ 5 ปริมาณจักจั่นอ้อย ข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ และ pH ในแปลงอ้อยเกษตรกร จ.กาญจนบุรี ในช่วงเดือนมกราคม-ตุลาคม 2565

เดือน	จำนวนจักจั่นอ้อย (ตัว)			อุณหภูมิ (°C)		ความชื้นสัมพัทธ์ (%)		pH
	กลุ่มไข่	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ดิน	อากาศ	ดิน	อากาศ	
ม.ค.	0	0	0	31.88	35.30	67.00	38.50	7.08
ก.พ.	0	0	0	27.78	30.20	67.43	35.70	5.15
มี.ค.	0	0	0	34.58	37.20	75.73	81.70	6.65
เม.ย.	0	0	0	35.88	41.10	74.08	53.20	7
พ.ค.	0	0	0.05	30.38	32.78	76.50	58.20	7
มิ.ย.	0	0	0	34.93	37.03	79.35	47.30	7
ก.ค.	0	0	0	32.08	33.50	78.25	59.00	7
ส.ค.	0	0	0	31.15	34.48	82.83	49.60	7
ก.ย.	0	0	0	28.63	30.23	80.58	71.40	7
ต.ค.	0	0	0	31.93	33.35	76.33	59.70	7
เฉลี่ย	0	0	0.005	31.92	34.52	75.81	55.43	6.79

หลักฐานที่ 6 ข้อมูลจำนวนไอโซเลทของเชื้อรา *Ganoderma* sp.

จากการสำรวจโรคลำต้นเน่าของปาล์มน้ำมัน พบลักษณะอาการทางใบพบรูปลักษณ์คล้ายอาการขาดน้ำ ยอดไม้คด และเกิดดอกเห็ดบริเวณรอบโคนต้นปาล์มน้ำมัน ส่งผลให้ผลผลิตลดลง อีกทั้งมักเกิดการโคนล้ม เนื่องจากภายในลำต้นของปาล์มน้ำมันโดนทำลายจากเส้นใยของเชื้อราทำให้เกิดการผุ เปื่อย และเมื่อเก็บตัวอย่างเชื้อรา *Ganoderma* spp. ในพื้นที่ระบาด 6 จังหวัด สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างได้ 41 ไอโซเลท ได้แก่ จังหวัดกระบี่ 21 ไอโซเลท คือ KBI01 KBI02 KBI03 KBI04 KBI05 KBI06 KBI07 KBI08 KBI09 KBI10 KBI11 KBI12 KBI13 KBI14 KBI15 KBI16 KBI17 KBI18 KBI19 KBI20 และ KBI21 จังหวัดตรัง 2 ไอโซเลท คือ TRG01 และ TRG02 จังหวัดนครศรีธรรมราช 6 ไอโซเลท คือ NRT01 NRT02 NRT03 NRT04 NRT05 และ NRT06 จังหวัดสุราษฎร์ธานี 10 ไอโซเลท คือ SNI01 SNI02 SNI03 SNI04 SNI05 SNI06 SNI07 SNI08 SNI09 และ SNI10 จังหวัดชุมพร 1 ไอโซเลท คือ CPN01 และจังหวัดปทุมธานี 1 ไอโซเลท คือ PTI01 โดยสามารถพบการเกิดเชื้อรา *Ganoderma* spp. ได้ทั้งในปาล์มน้ำมันรอบที่ 1 อายุในช่วง 10-30 ปี แปลงปาล์มน้ำมันที่เคยเป็นแปลงมะพร้าว เช่น NRT06 ตำบลเกาะหวด อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช และแปลงส้มเก่า ได้แก่ PTI01 ตำบลบึงชำอ้อ อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จากการสำรวจยังพบว่าแปลงปาล์มน้ำมันที่ปล่อยต้นรอบที่ 1 ยืนต้นตายภายในแปลงเป็นแหล่งสะสมเชื้อ (source inoculum) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเชื้อรา *Ganoderma* spp. จากแหล่งระบาด

ไอโซเลท	สถานที่			ละติจูด	ลองจิจูด
	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด		
KBI01	คีรีวง	ปลายพระยา	กระบี่	8.473112	98.802996
KBI02	เขาใหญ่	อ่าวลึก	กระบี่	8.484172	98.753613
KBI03	นาเหนือ	อ่าวลึก	กระบี่	8.506167	98.710337
KBI04	เขานคราม	เมือง	กระบี่	8.202931	98.818807
KBI05	เพหลา	คลองท่อม	กระบี่	8.025296	99.105411
KBI06	เขาใหญ่	อ่าวลึก	กระบี่	8.405835	98.740492
KBI07	เขาใหญ่	อ่าวลึก	กระบี่	8.405835	98.740492
KBI08	เขาใหญ่	อ่าวลึก	กระบี่	8.405835	98.740492
KBI09	เขาใหญ่	อ่าวลึก	กระบี่	8.405835	98.740492
KBI10	เขาใหญ่	อ่าวลึก	กระบี่	8.405835	98.740492
KBI11	เขาพนม	เขาพนม	กระบี่	8.259917	99.036213
KBI12	เขาพนม	เขาพนม	กระบี่	8.264208	99.066617
KBI13	เขาพนม	เขาพนม	กระบี่	8.258294	99.073570
KBI14	เขาพนม	เขาพนม	กระบี่	8.168755	99.024472
KBI15	ห้วยน้ำขาว	คลองท่อม	กระบี่	7.852481	99.139097
KBI16	คลองยาง	เกาะลันตา	กระบี่	7.827602	99.095010
KBI17	คลองยาง	เกาะลันตา	กระบี่	7.825644	99.093962
KBI18	ห้วยน้ำขาว	คลองท่อม	กระบี่	7.846162	99.134411
KBI19	คลองท่อมใต้	คลองท่อม	กระบี่	7.980521	99.137143
KBI20	เพหลา	คลองท่อม	กระบี่	8.025519	99.105356
KBI21	เพหลา	คลองท่อม	กระบี่	8.025529	99.105356
TRG01	กะลาเส	สิเกา	ตรัง	7.675463	99.316555
TRG02	กะลาเส	สิเกา	ตรัง	7.761930	99.323036
NRT01	ขนอม	ขนอม	นครศรีธรรมราช	9.167132	99.845362
NRT02	แหลม	หัวไทร	นครศรีธรรมราช	8.004494	100.211989
NRT03	ร่อนพิบูลย์	ร่อนพิบูลย์	นครศรีธรรมราช	8.151689	99.827477
NRT04	บางขัน	บางขัน	นครศรีธรรมราช	8.109146	99.450038
NRT05	เขาแก้ว	ทุ่งสง	นครศรีธรรมราช	8.208292	99.533297
NRT06	เกาะหวด	ปากพนัง	นครศรีธรรมราช	8.265404	100.091350
SNIO1	บางไทร	เมือง	สุราษฎร์ธานี	9.145296	99.265000
SNIO2	ไชยคราม	ดอนสัก	สุราษฎร์ธานี	9.242676	99.626739
SNIO3	ไทรซิง	พระแสง	สุราษฎร์ธานี	8.550331	99.052898
SNIO4	ไทรซิง	พระแสง	สุราษฎร์ธานี	8.550331	99.052898
SNIO5	ไทรซิง	พระแสง	สุราษฎร์ธานี	8.550331	99.052898
SNIO6	ไทรซิง	พระแสง	สุราษฎร์ธานี	8.547007	99.057453

ไอโซเลข	สถานที่				
	ตำบล	อำเภอ	จังหวัด	ละติจูด	ลองจิจูด
SNI07	ไทรซิ่ง	พระแสง	สุราษฎร์ธานี	8.556886	99.115458
SNI08	ไทรโสภา	พระแสง	สุราษฎร์ธานี	8.561099	99.112866
SNI09	ทุ่ง	ไชยา	สุราษฎร์ธานี	9.412561	99.197636
SNI10	พุมเรียง	ไชยา	สุราษฎร์ธานี	9.386932	99.234489
CPN01	ทุ่งหลวง	ละแม	ชุมพร	9.7915003	99.0681668
PTE01	บึงชำอ้อ	หนองเสือ	ปทุมธานี	14.1816947	100.7974204

หลักฐานที่ 7 ไพรเมอร์จากกลุ่มยีนทนทานโรคลำต้นเน่าในปาล์มน้ำมัน

ยีน EgIFR (isoflavone reductase-like protein) และ EgMT-1 (metallothionein-like protein) เป็นยีนที่บ่งชี้ถึงลักษณะทนทานโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน โดยไพรเมอร์ของยีน EgIFR คือ EgIFR_F (AAGCTCCTGGACGACTTCAA) EgIFR_R (ATGGGAGGAAGTAACCAGCA) และไพรเมอร์ของยีน EgMT-1 คือ EgMT-1_F (AGGCAAATGTGGCTGTGGCGTT) EgMT-1_R (ACTTGCAGTTGCAGCCTCCGTT) สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ทนทานและไม่ทนทานต่อโรคลำต้นเน่าปาล์มน้ำมัน (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับใช้วิเคราะห์ยีนทนทานในปาล์มน้ำมัน

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ความยาว (bp)	อ้างอิง
1	EgCAPX-1_F	AGGCCGTCGACAAGTGCAAGAA	300 bp	Putranto <i>et al.</i> (2016)
	EgCAPX-1_R	AATAGCCTCACGGCGATGTCCA		
2	EgCHI2_F	AACGGCACCGGATGGTCCTTAT	400 bp	Putranto <i>et al.</i> (2016)
	EgCHI2_R	ACCATCAAATCCCAAGGCCCGT		
3	EgEMLP1-1_F	AGAGCGTTTTGGCTGAAGGT	300 bp	Putranto <i>et al.</i> (2016)
	EgEMLP1-1_R	AGAACTGCGCGCTCTAAGAC		
4	EgMT-1_F	AGGCAAATGTGGCTGTGGCGTT	700 bp	Putranto <i>et al.</i> (2016)
	EgMT-1_R	ACTTGCAGTTGCAGCCTCCGTT		
5	EgSPI-1_F	ATGGCCTTGCTGCAATAGGTGC	220 bp	Putranto <i>et al.</i> (2016)
	EgSPI-1_R	AAATAGCTTCTCGGCGGCGACT		
6	EgBBI1_F	GGTGAGAGCAGTAGAAAGCC	250 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)
	EgBBI1_R	CAACAACGCATTGGTCATCG		
7	EgDFS_F	GAGTCGCAGAGCCACAAGTT	150 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)
	EgDFS_R	ACAATGTTTTGGTGAGAAGCAG		
8	EgPRP_F	TGTGCGACGACGGTGATAC	160 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)
	EgPRP_R	CGGCACACCACCAATATGACA		
9	EgT2RIP_F	AACCAAGACCGCTGCCTCA	270 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ความยาว (bp)	อ้างอิง
	EgT2RIP_R	GCTGGAGACACCGCAAGAGA		
10	EgDHN_F	ATGAAGGCCAGCATGAGAAG	200 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)
	EgDHN_R	CTTATACCACGCGAACACCA		
11	EgGRRBP_F	AGGAACATCACCGTCAACGAG	280 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)
	EgGRRBP_R	CTCCTTGAACCCAGCCCTCT		
12	EgIFR_F	AAGCTCCTGGACGACTTCAA	1,500 bp	Tan <i>et al.</i> (2013)
	EgIFR_R	ATGGGAGGAAGTAACCAGCA		

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ออกแบบเพื่อใช้จำแนกปาล์มน้ำมันทันทานต่อโรคลำต้นเน่า

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	จำนวนเบส	ค่าTm (องศาเซลเซียส)	ความยาว (bp)
	Eg_SSR1F	AAAGACGCATGGACGATCTC	20		
1	Eg_SSR1R	GGTGGGTTAGATTGAGGGCC	20	53	246
	Eg_SSR2F	GTGATTTGTGGAGAGCTTGCA	21		
2	Eg_SSR2R	TGGCCAACCAATCACCCTT	20	53	232
	Eg_SSR3F	ACAAGTTTCCCCTATGCCGT	20		
3	Eg_SSR3R	CTCCTTCTTCTGCTTCCCCG	20	53	263
	Eg_SSR4F	CCCATAACCCTCGCAATCCTC	20		
4	Eg_SSR4R	GCTCGTACCTCTTCGACTCG	20	53	649
	Eg_SSR5F	TCGTTGCAACAATCATGGCC	20		
5	Eg_SSR5R	GTTACTGCAGGTGGGCTTCT	20	53	219
	Eg_SSR6F	CCGGAGAAGAAGCCCAACAA	20		
6	Eg_SSR6R	TTGTTGTCGGCCTTTGGAGA	20	53	218
	Eg_SSR7F	AGACTTTTGGTGGTCTCACTCA	22		
7	Eg_SSR7R	GAGGTCTGTGGAGGGTCAGA	20	55	200
	Eg_SSR8F	GGTTGCCATGAAGTCTACTGTG	22		
8	Eg_SSR8R	CTTAAAAGGATTGACATGGAGAAAG	26	55	205
	Eg_SSR9F	ACTTCAAATGCCCTGAAATGT	23		
9	Eg_SSR9R	AGCATCATCTCATGTTTGCAGA	22	55	269
	Eg_SSR10F	TGAGAATGGAAGACTATAGTATTGTCA	27		
10	Eg_SSR10R	TGGTTTCCGGGTAGGGACAT	20	55	269
	Eg_SSR11F	GTCCTCCATTCTTTCTC	21		
11	Eg_SSR11R	CTCGCTAAAACAATCTACTTTCTCC	26	55	268
	Eg_SSR12F	ACGACTCAAATTCGGGTTAGA	22		
12	Eg_SSR12R	AGATCCTCCCTACCCGCAA	20	55	227
	Eg_SSR13F	TCTTCTTCCAAGACCGAGTCA	21		
13	Eg_SSR13R	GTCTACAGCTCCGATCACCG	20	55	235

ลำดับ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	จำนวนเบส	ค่าTm (องศาเซลเซียส)	ความยาว (bp)
14	Eg_SSR14F	GCATCATCATCTGCAACTTCAA	22	55	280
	Eg_SSR14R	GGGATCGAGATAGAGGAGGTC	21		
	Eg_SSR15F	AGTGATTTGTGGAGAGCTTGC	21		
15	Eg_SSR15R	TGGCCAACCAATCACCATT	20	55	233

ภาคผนวก 2.2 ต้นฉบับบทความวิจัย (Manuscript) จำนวน 1 เรื่อง

หลักฐานที่ 8 การพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฟอยและโรคกอตะไคร้อ้อยในครั้งเดียว

นำเสนอผลงานวิจัย เรื่อง การพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฟอยและโรคกอตะไคร้อ้อยในครั้งเดียว ภาคโปสเตอร์ ในการประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 24 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และผลงานได้ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 51 ฉบับเพิ่มเติม 1 2566

ภาคผนวก 3 หลักฐานเชิงประจักษ์ของการนำผลงานไปใช้ประโยชน์

หลักฐานที่ 9 การถ่ายทอดวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยโดยใช้เทคนิค LAMP ให้กับเจ้าหน้าที่ของบริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา 3 เพื่อตรวจคัดกรองโรคใบขาวอ้อยในแปลงพันธุ์ก่อนนำไปขยายพันธุ์ให้กับเกษตรกร วันที่ 12 กรกฎาคม 2565 จำนวน 25 ราย ณ แปลง บริษัท ดงบ้านโพธิ์ จำกัด หมู่ 7 ตำบลห้วยดง อำเภอเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์



KTIS
More Than Sugar

บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน)
Kaset Thai International Sugar Corporation Public Company Limited

ที่ กท.๐๑๗/๒๕๖๕

๓ กรกฎาคม ๒๕๖๕

เรื่อง ขอความอนุเคราะห์วิทยากร
เรียน ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

เนื่องด้วย บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา ๓ มีความสนใจการจัดการแปลงพันธุ์อ้อยออก แต่ในขั้นที่ปลูกอ้อยของบริษัทฯ พบอาการของโรคใบขาวในบางพื้นที่ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการตรวจคัดกรองโรคใบขาวแปลงพันธุ์ก่อนนำไปขยายพันธุ์ในแปลงไร่ของเกษตรกรรายย่อย ขาดบริษัทที่มีความเชี่ยวชาญใช้เทคนิค LAMP ได้ในชื่อ My Abscope ซึ่งทางบริษัททราบว่า ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน มีความรู้และสามารถให้บริการ My Abscope ตรวจสอบโรคใบขาวในแปลงไร่ได้ ในวันที่ ๑๒ กรกฎาคม ๒๕๖๕ เวลา ๑๓.๐๐-๑๖.๐๐ น. สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ขอเชิญ อาจารย์ ดร.ณัฐพร นิลรัมย์ และคุณ อรุณรัตน์ นิลรัมย์ วิทยากรผู้เชี่ยวชาญในองค์ความรู้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณา และขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ
(นายวิวัฒน์ สิริวงศาทร)
ผู้จัดการโรงงาน



ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
๑๘๐ หมู่ ๒๗ ตำบลศิลา
อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น
๕๐๐๐๐

๕ กรกฎาคม ๒๕๖๕

เรื่อง ขอรับการเป็นวิทยากร
เรียน ผู้จัดการบริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา ๓
อ้างถึง หนังสือบริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา ๓ ที่ กท.๐๑๗/๒๕๖๕ ลงวันที่ ๖ กรกฎาคม ๒๕๖๕

ตามที่หนังสือที่อ้างถึง บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน) สาขา ๓ ขอความอนุเคราะห์วิทยากรบรรยายให้ความรู้และสาธิตการใช้เครื่อง My Abscope ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย ในวันที่ ๑๒ กรกฎาคม ๒๕๖๕ เวลา ๑๓.๐๐-๑๖.๐๐ น. ณ แปลงบริษัท ดงบ้านโพธิ์ หมู่ที่ ๗ ตำบลห้วยดง อำเภอเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์ นั้น

ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นพิจารณาแล้ว เห็นว่านายวิวัฒน์ นิลรัมย์ วิทยากรเกษตรชำนาญการ เข้าร่วมเป็นวิทยากรบรรยายให้ความรู้และสาธิตการใช้เครื่อง My Abscope ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย ตามวัน เวลา และสถานที่ข้างต้น

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ
(นางสาวจิราลักษณ์ ภูมิธโรง)
ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
โทรศัพท์ ๐ ๕๒๒๐ ๓๕๐๖
โทรสาร ๐ ๕๒๒๐ ๓๕๐๕
E-mail : kktcrcoo@gmail.com



ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

Khao Kaen Field Crops Research Center

บรรยายให้ความรู้และสาธิตการตรวจโรคอ้อย แก่เจ้าหน้าที่บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ซุการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด (มหาชน)

วันที่ 12 กรกฎาคม 2565



นางสาวจิราลักษณ์ ภูมิธโรง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ได้มอบหมายให้นางวิวัฒน์ นิลรัมย์ วิทยากรเกษตรชำนาญการ และนางอรุณรัตน์ นิลรัมย์ วิทยากรเกษตรชำนาญการ เป็นวิทยากรบรรยายให้ความรู้และสาธิตการตรวจวินิจฉัยและกำจัดโรคใบขาวอ้อยด้วยเครื่อง My Abscope ให้กับเกษตรกรรายย่อย จำนวน 25 ราย ณ แปลงไร่ของ บริษัท ดงบ้านโพธิ์ จำกัด หมู่ 7 ตำบลห้วยดง อำเภอเก้าเลี้ยว จังหวัดนครสวรรค์

กรมวิชาการเกษตร