การบ่งบอกเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไยโดยการประยุกต์ใช้เทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

กนกวรรณ เหรา

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การบ่งบอกเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไยโดยการประยุกต์ใช้เทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

กนกวรรณ เหรา

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
พฤษภาคม 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การบ่งบอกเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไยโดยการประยุกต์ใช้

เทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

ของ กนกวรรณ เหรา

ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์)

.....กรรมการ .....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร)

.....กรรมการ .....กรรมการ

(ดร.ขรรค์ชัย ดั้นเมฆ) (ดร.พนินาฎ อู่พุฒินันท์)

อนุมัติ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สินค้างาม)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

พฤษภาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษา คณาจารย์ และบุคลากรต่าง ๆ ทุกท่าน ที่ให้ความกรุณาชี้แนะแนวทางการศึกษาค้นคว้าข้อมูลที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขการเขียนวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอบขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จลุล่วงไปด้วยดี ช่วยเหลือในด้านวิชาการ ความรู้ และแนวปฏิบัติต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลองมาตลอด และให้ประโยชน์ตั้งแต่เริ่มต้น จนกระทั่งการทดลองเสร็จสิ้น ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ที่มีส่วนช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ครอบครัว ที่ให้กำลังใจมาตลอดการศึกษา

กนกวรรณ เหรา

เรื่อง: การบ่งบอกเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไยโดยการประยุกต์ใช้เทคนิค Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

ผู้วิจัย: กนกวรรณ เหรา, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2563

ประธานที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ดร.สุภัค มหัทธนพรรค, **กรรมการที่ปรึกษา**: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภาพร ภัสสร

คำสำคัญ: ลำไย, โรคผลลาย, Loop mediated amplification (LAMP)

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการที่ระบุสาเหตุของการเกิดโรคผลลายของลำไย โดยคัดแยกเชื้อรา 20 ไอโซเลท ที่ถูกเก็บรวบรวมมาจากผลลำไยที่เป็นโรค ด้วยวิธีการ Tissue transplant method และทดสอบหาไอโซเลทนั้น โดยใช้วิธีการของ Koch's postulation method ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับแปลงทดสอบ จากการทดสอบ พบว่า ไอโซเลทที่ 17 นั้น คือสาเหตุของการทำให้เกิดโรคผลลาย โดยมีการแสดงออกของโรคเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งในการทดลองแบบสภาพกล่องชื้น (moisture chamber) และสภาพสวน ที่ระดับ 58.33% และ 60.00% ตามลำดับ หลังจากนั้นเชื้อราที่แยกได้จะถูกนำไประบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอ พบว่า มีความคล้ายคลึง โดยมีค่า identity 99% กับ *Pestalotiopsis oxyanthi* isolate SVJM060, *Pestalotiopsis sp.* Vouchcz JUF0010 และ *Pestalotiopsis* sp. Vouchcz JUF0010 นอกจากนั้นการใช้เทคนิค Loop mediated amplification (LAMP) โดยใช้ primer FIP/BIP และ primer F3/B3 ได้ยืนยันผลการทดสอบที่ให้ผลบวกกับเชื้อรานี้ด้วย จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า สายพันธุ์ของ *Pestalotiopsis* เป็นสาเหตุในการทำให้เกิดโรคผลลายได้

Title: FRUIT DISCOLORING IDENTIFICATION IN LONGAN BY APPLICATION OF LOOP MEDIATED ISOTHEMAL AMPLIFICATION (LAMP)

Author: Kanokwan Hera, Thesis: M.S. (Biotechnology), University of Phayao, 2020.

Advisor: Associate Professor Dr.Supuk Mahadtanapuk, **Co-advisor:** Assistant Professor Dr.Supaporn Passorn

Keywords: *Dimocarpus longan* Lour., Fruit Discoloring, Loop mediated amplification (LAMP)

ABSTRACT

The aim of study was to search for the possible identity causing of the Fruit Discoloring disease. The 20 isolates fungal were collected from longan diseased by Tissue transplant method. The isolates were tested by Koch's postulation method in laboratory lever and field. It was found that, The fungal causal agent of Unknown 17 was presented significant to disease increase of the Fruit Discoloring disease symptom with 58.33 % and 60.00 % incidence in moisture chamber and orchard condition. After that, the isolates was identified by DNA technique with high identity with 99% as *Pestalotiopsis oxyanthi* isolate SVJM005 , *Pestalotiopsis oxanthi* isolate SVJM060 and *Pestalotiopsis* sp. Vouchcz JUF0010. Moreover, the application of Loop mediated amplification (LAMP) by using primer FIP/BIP and F3/B3 Primers was confirmed with positive test. These results suggest that the species of *Pestalotiopsis* to be the most important part of causing in Fruit Discoloring disease.

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	ลำไย	4
	ลักษณะพฤกษศาสตร์และพันธุ์ลำไย	7
	พันธุ์ที่ส่งเสริมในการปลูก	9
	การปลูกลำไยและการดูแลรักษา	10
	โรคพืชของลำไย	14
	โรคผลแตกผลลายในลำไย	17
	การประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบโรคพืช	19
	หลักการของเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	22
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	29
	วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องแก้ว	29
	ขั้นตอนและวิธีการวิจัย	32
4	**ผลการวิจัย**	40
	การเก็บตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลายเพื่อนำมาวิเคราะห์สาเหตุโรค.	40
	การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)	41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

4 ผลการวิจัย (ต่อ) 40

การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย 43

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) 44

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค 55

การหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไย 59

การตรวจสอบเชื้อก่อโรคลำไยด้วยเทคนิค Loop mediated amplification (LAMP) .. 63

5 บทสรุป 66

สรุปผลการวิจัย 66

อภิปรายผลการวิจัย 69

ข้อเสนอแนะ 72

บรรณานุกรม 73

ภาคผนวก 80

ภาคผนวก ก เทคนิคการแยกเชื้อ 81

ภาคผนวก ข การศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา โดยเทคนิค slide culture 84

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 85

ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมี 86

ภาคผนวก จ การวิเคราะการวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis 89

ภาคผนวก ฉ หลักการในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการเตรียมเพื่อศึกษา ด้วย
กล้อง SEM 90

ภาคผนวก ช การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Haemacytometer 92

ภาคผนวก ซ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Generuler 1 kb plus DNA Ladder (invitrogen™) 95

ภาคผนวก ฌ ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลายในลำไย
ระดับห้องปฏิบัติการ 96

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

ภาคผนวก (ต่อ) 80
ภาคผนวก ญ ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลายในลำไย
ระดับแปลงทดลอง..... 97
ภาคผนวก ฎ นิยามศัพท์เฉพาะ 98

ประวัติผู้วิจัย 100

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

1 การส่งออกลำไยสดและผลิตภัณฑ์ ปี 2553–2558..... 5
2 การบริโภคภายในประเทศและการส่งออกลำไยสดและผลิตภัณฑ์ปี 2553–2558 6
3 เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ลำไย ปี 2553–2558 6
4 เนื้อที่ยืนต้น เนื้อให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2562 7
5 ส่วนผสมในการตรวจหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP..... 38
6 ลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP PCR..... 39
7 ค่าเฉลี่ยผลลายในแต่ละไอโซเลต ทั้ง 20 ไอโซเลท ในระดับกล่องทดลอง 56
8 ค่าเฉลี่ยผลลายในแต่ละไอโซเลต ทั้ง 20 ไอโซเลท ในระดับแปลงทดลอง..... 58
9 ผลบวกและผลลบของดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำ LAMP PCR จากการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราโดยการใช้ Primer ในปฏิกิริยา LAMP PCR..... 65
10 ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลาย ระดับห้องปฏิบัติการ..... 96
11 ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลาย ระดับแปลงทดลอง 97

สารบัญภาพ

ภาพ **หน้า**

1 แผนที่แปลงลำไยของเกษตรกรบ้านต๋ำ อ.เมือง จ.พะเยา 32
2 รายละเอียดโปรแกรม PCR running condition 37
3 ตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลาย 40
4 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนผลลำไยจากพื้นที่ ตำบลบ้านต๋ำ ที่มีการระบาดของโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป 41
5 การศึกษาตัวอย่างศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) 42
6 การแยกหาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค (tissuetransplant)..... 43
7 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) โดยวิธีการ Sub culture . 44
8 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 1 45
9 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 2.. 45
10 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 3.. 46
11 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 4.. 46
12 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 5.. 47
13 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 6.. 47
14 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 7.. 48
15 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 8.. 48
16 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 9.. 49
17 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 10 49
18 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 11. 50
19 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 12 50
20 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 13 51
21 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 14 51
22 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 15 52
23 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 16 52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
24	การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 17	53
25	การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 18	53
26	การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 19	54
27	การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 20..	54
28	การทดสอบเชื้อราที่คัดแยกได้มาทดสอบบนผลลำไยในระดับห้องปฏิบัติการ	55
29	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นลำไย	57
30	การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคผลลาย	58
31	genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อราไอโซเลท Unknown17 ที่คัดเลือกจากลำไย ที่เป็นสาเหตุโรคผลลายเปรียบเทียบกับ1 kb plus DNA ladder (แถวที่ 1).....	60
32	PCR product ของเชื้อราสาเหตุโรคผลลาย โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS4 และ ITS5 เมื่อเทียบกับ 1 kb plus DNA Ladder.....	61
33	ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อราไอโซเลท 17.....	62
34	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราที่คัดเลือกกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ บนฐานข้อมูล GenBank.....	63
35	ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำ LAMP PCR จากการระบุสายพันธุ์ ของเชื้อราโดยการใช้ Primer ในปฏิกิริยา LAMP PCR.....	64
36	หลักการแยกเชื้อจากชิ้นพืช (Pathogen isolation from plant parts).....	82
37	Haemacytometer.....	92
38	บริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C, D และ E.....	93
39	แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder.....	95

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลำไยเป็นไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญอันดับหนึ่งของจังหวัดในเขตภาคเหนือ คือ 8 จังหวัดภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน พะเยา น่าน ลำปาง แพร่ และจังหวัดตาก โดยพื้นที่การผลิต ปี 2553–2557 เพิ่มขึ้นจาก 975,445 ไร่ ในปี 2553 เป็น 1,052,111 ไร่ ในปี 2557 หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.00 ต่อปี โดยจังหวัดพะเยา เป็นแหล่งปลูกลำไยที่สำคัญ มีพื้นที่ปลูกเป็นอันดับ 4 ของประเทศ มีพื้นที่ให้ผลผลิต 55,316 ไร่ มีผลผลิตในปี 2558 ประมาณ 28,135 ตัน หรือ 509 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559, สื่อออนไลน์) ลำไยเป็นผลไม้กึ่งเขตร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีนตอนใต้ และไต้หวัน ลำไยเป็นพืชอยู่ในตระกูล *Sapindaceae* เช่นเดียวกับเงาะ และลิ้นจี่ (พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์, ดุษฎี ณ ลำปาง และรำไพวรรณ อภิชาตพงศ์ชัย, 2542) โดยมีการส่งออกในรูปของลำไยสด ลำไยอบแห้ง และลำไยกระป๋อง ซึ่งมีตลาดส่งออกลำไยสดที่สำคัญ ได้แก่ จีน ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ แคนาดา และตลาดลำไยแปรรูป ได้แก่ จีน ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ และสหรัฐอเมริกา (จริยา วิสิทธิพานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง, 2545)

ในการผลิตลำไยให้ได้ผลผลิตเป็นจำนวนมากและมีคุณภาพดี เป็นที่ต้องการของตลาด ยังพบประสบปัญหาในหลาย ๆ ด้าน ทั้งโรคของลำไยที่เกิดจากรามีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ โรคใบจุด โรคพุ่มไม้กวาด โรคราสีชมพู โรคราดำ และสาเหตุของโรคลำไยที่เป็นปัญหามากที่สุด คือ โรคผลลาย และโรคผลแตก ในลำไย ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งนั้นก็คือ ยังหาวิธีการป้องกันกำจัดไม่ได้ ทำให้ผลผลิตลำไยเกิดความเสียหายอย่างรุนแรง และเกษตรกรชาวสวนลำไยสูญเสียรายได้และขาดทุนในที่สุด จากการสืบค้นรายงานผลการวิจัย โรคผลลายของลำไยสันนิษฐานว่า มีสาเหตุหลายประการ สาเหตุแรกอาจเป็นเพราะว่ามีเชื้อก่อโรค จากรายงานวิจัยปัจจุบันยังไม่สามารถระบุชัดเจนในระดับสายพันธุ์ และเชื้อที่ศึกษานั้นไม่ได้ศึกษาในจังหวัดพะเยา ซึ่งอาจเป็นเชื้อคนละชนิดหรือเป็นเชื้อเฉพาะถิ่น หรือโรคดังกล่าวอาจเกิดจากปัญหาทางสรีรวิทยาของผล อันมีสาเหตุจากสภาพแวดล้อม หรือจากการดูแลบำรุงต้นที่ไม่เหมาะสมของเกษตรกรเบื้องต้นนักวิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อสาเหตุโรคได้บางส่วนแล้ว ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุโรคผลแตกผลลาย ซึ่งต้องทำยืนยันผลต่อไป ปัจจุบันเกษตรกรที่ประสบปัญหาในจังหวัดพะเยา คาดว่าสาเหตุโรคน่าจะเป็นเชื้อก่อโรค เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาหาสาเหตุที่ชัดเจน

จึงแก้ไขปัญหาโดยการฉีดพ่นสารเคมีแบบเดาสุ่ม ทำให้เกิดใช้สารเคมีปริมาณสูงและทำให้เชื้อก่อโรคดื้อยา ทำให้แก้ไขไม่ตรงจุด นอกจากนี้ในจังหวัดพะเยายังไม่มีการศึกษาทั้งการระบาดวิทยาและสาเหตุที่แท้จริงของโรคดังกล่าว และยังไม่มีแนวทางการป้องกันกำจัดที่ชัดเจน ในการทำวิจัยจะทำการหาแนวทางแก้ไขโรคผลลายที่เหมาะสมกับการผลิตลำไยส่งออกในพื้นที่ต้นแบบในจังหวัดพะเยา จึงใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการบ่งบอกเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไย เทคนิค Loop mediated amplification (LAMP) สามารถตรวจสอบเชื้อได้ในปริมาณน้อยในระดับนาโนกรัม ให้เวลาในการตรวจสอบน้อยกว่า 1 ชั่วโมง ซึ่งสามารถตรวจเชื้อสาเหตุโรคได้ในระยะที่ลำไยยังไม่แสดงอาการโรค จะทำให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างรวดเร็วและทันเวลาและลดการระบาดของโรคได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคลำไยที่เป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรผู้ผลิตลำไยส่งออกของไทย และยังมีการใช้เทคนิคนี้ ในการตรวจตรวจสอบในพืชผลไม้ทั่วไป เช่น การตรวจสอบเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ไอโซเลท TH-PK-2016 (SLCuYV-TH-PK-2016) (Genbank accession KX388157) ที่เข้าทำลายฟักทอง (*Cucurbita moschata* Decne) ในจังหวัดนครปฐมของประเทศไทย โดยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที และสามารถตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis พบว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบเชื้อ *Begomovirus* ได้ที่ค่าการเจือจางที่ 10^{-3} หรือที่ความเข้มข้นดีเอ็นเอประมาณ 134 พิโคกรัมต่อไมโครลิตร ในเวลา 1 ชั่วโมง (รุ่งทิพย์ จั่นเพ็ชร และคณะ, 2560) นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจหาเชื้อ Human papillomavirus type 58 โดยใช้ดีเอนเอตัวอย่างจากผู้ป่วยมะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค Loop-Mediated isothermal amplification โดยผลการทดสอบหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา LAMP ผลจาก agarose gel electrophoresis 2% ใช้อุณหภูมิที่ 63 °C และระยะเวลาที่เหมาะสม คือ 60 นาที (จิตรลดดา แซ่เตียว และคณะ, 2011)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะอาการของโรคผลลายในลำไย โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM)
2. แยกเชื้อราสาเหตุโรคผลลายในลำไยและทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับแปลงทดลอง
3. เพื่อการหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคในลำไย
4. เพื่อตรวจสอบเชื้อก่อโรคลำไยด้วยเทคนิค Loop mediated amplification (LAMP)

ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผลลายในลำไย เพื่อทดสอบการเกิดโรคผลลายในลำไย โดยการทดสอบบนต้นลำไย อย่างน้อย 20 ไอโซเลท ต้นลำไยที่พ่นด้วยแต่ละไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกเชื้อราไอโซเลทที่ทำให้มีอาการของโรคระบุสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ และตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยเทคนิค Loop mediated amplification (LAMP)

ขอบเขตด้านระยะเวลา

การศึกษาครั้งนี้ใช้เวลาในการศึกษาค้นคว้าและทดลองเป็นระยะเวลา 1 ปี

ขอบเขตด้านสถานที่

ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยพะเยา คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. เป็นประโยชน์ในการระบุชนิดโรคและการป้องกันกำจัดที่ถูกต้องเหมาะสมกับสาเหตุโรค

2. ทราบลำดับเบสของ DNA เครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อราสาเหตุโรคผลลายในลำไย และสภาวะการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโดย เทคนิค Loop mediated amplification (LAMP) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคพืชที่รวดเร็วในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลำไย

ลำไย จัดอยู่ใน

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta

Class: Magnoliophyta

Order: Sapindales

Family: Sapindaceae

Genus: *Dimocarpus*

ลำไยเป็นพืชผสมข้าม (เกศิณี ระมิงค์วงศ์, 2546) คำว่า longan มาจากภาษาจีน หมายถึง ตามังกร มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan Lour*. แบ่งเป็น 2 subspecies คือ *D. longan ssp*. longan และ *D. longan ssp*. malesianus อยู่ในตระกูล Sapindaceae มีความเชื่อกันว่า ลำไยมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีนหรือจากบริเวณระหว่างประเทศพม่าและอินเดีย (Yonemoto, et al., 2006) และลำไยจากประเทศจีนได้แพร่กระจายเข้าสู่ประเทศอินเดีย ศรีลังกา พม่า ฟิลิปปินส์ ประเทศในแถบยุโรป และอเมริกา สำหรับในประเทศไทยนั้น มีการพบลำไยพื้นเมืองตามป่า ในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย ซึ่งมีผลเล็ก ต่อมาในปี พ. ศ. 2439 มีชาวจีนนำกิ่งตอนของลำไย 5 กิ่ง จากประเทศจีน มาถวายเจ้าดารารัศมี พระชายาของพระบาทสมเด็จ–พระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 5 ซึ่งเจ้าดารารัศมี ได้แบ่งลำไยเอาไว้ปลูกที่กรุงเทพฯ 2 กิ่ง ส่วนอีก 3 กิ่ง ได้มอบให้เจ้าน้อยต้น ณ เชียงใหม่ นำไปปลูกที่เชียงใหม่ ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังจังหวัดใกล้เคียง และเนื่องจากในอดีตการขยายพันธุ์ลำไยทำโดยการเพาะเมล็ดจึงทำให้เกิดการกลายพันธุ์ และได้พันธุ์ที่ดีเกิดขึ้น (พาวิน มะโนชัย และคณะ, 2547)

ลำไย ไม้ผลเขตกึ่งร้อนเป็นผลไม้เพื่อสุขภาพชนิดนี้ เป็นที่นิยมรับประทานอย่างมากในประเทศไทย โดยจังหวัดที่ปลูกมากที่สุด คือ จังหวัดลำพูน สำหรับประเทศที่ปลูกมากที่สุดเห็นจะเป็นประเทศจีนที่มีการปลูกลำไยมากถึง 26 สายพันธุ์ แต่ที่นิยมปลูกในประเทศไทยทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยไม่ต่ำกว่าปีละ 6, 000 ล้านบาท จากการสำรวจในปี พ. ศ. 2555 พบว่า มีพื้นที่ปลูกลำไยประมาณ 1,077, 599 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2557, สื่อออนไลน์) ซึ่งพันธุ์ลำไยที่นิยมปลูกมี 4 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์อีดอ สีชมพู แห้ว และเบี้ยวเขียว

(มิตรชัย ทาบุดดา, 2546) โดยจากการสำรวจในปี พ. ศ. 2552 พบว่า มีพื้นที่ปลูกลำไยพันธุ์อีดอ ร้อยละ 79 ของพื้นที่ทั้งหมด (นิพัฒน์ สุขวิบูลย์, 2552) ทำให้พันธุ์ลำไยที่ปลูกในปัจจุบันมีความหลากหลายทางพันธุกรรม หากเกิดโรคระบาดหรือภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงอาจจะทำให้ลำไยสูญพันธุ์ได้ จึงควรมีการปรับปรุงพันธุ์ลำไยให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามต้องการ และเพื่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไยต่อไป ลำไยประกอบด้วย วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ธาตุแคลเซียม ธาตุฟอสฟอรัส ธาตุโซเดียม ธาตุโพแทสเซียม ธาตุทองแดง ธาตุเหล็ก วิตามินซี วิตามินบี 12 เป็นต้น ส่วนในด้านสรรพคุณลำไยใช้เป็นยารักษาโรค ได้แก่ เป็นยาแก้ท้องร่วง รักษาโรคมาลาเรีย บรรเทาอาการริดสีดวงทวาร เป็นต้น พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์, ดุษฎี ณ ลำปาง และรำไพวรรณ อภิชาตพงศ์ชัย, 2542)

ลำไย จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ทำรายได้เป็นอย่างดีแก่เกษตรกรในภาคเหนือของประเทศไทย และถูกบรรจุเป็นหนึ่งในพืชที่ทำรายได้เข้าประเทศได้สูง (product champion) โดยสามารถทำรายได้เข้าประเทศได้มากกว่าห้าพันล้านบาท โดยมีการส่งออกในรูปของลำไยสด ลำไยอบแห้ง และลำไยกระป๋อง ซึ่งตลาดส่งออกลำไยสดที่สำคัญ ได้แก่ จีน ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ แคนาดา และตลาดลำไยแปรรูป ได้แก่ จีน ฮ่องกง มาเลเซีย สิงคโปร์ และสหรัฐอเมริกา โดยมีการส่งออกในรูปลำไยสด มูลค่าส่งออก 9,500 ล้านบาท ลำไยอบแห้ง มูลค่า 4,700 ล้านบาท ในปี 2557 ดังแสดงในตาราง 1 ส่วนการบริโภคลำไยภายในประเทศมีปริมาณน้อยกว่าการส่งออกลำไยสด และผลิตภัณฑ์ดังแสดงในตาราง 2 และเนื้อที่การผลิตลำไยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี 2553–2558 ดังแสดงในตาราง 3 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2559, สื่อออนไลน์) และตาราง 4 จะแสดงถึงเนื้อที่ยืนต้น เนื้อให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ในปี 2562

ตาราง 1 การส่งออกลำไยสดและผลิตภัณฑ์ ปี 2553–2558

ปี	ลำไยสด		ลำไยอบแห้ง		ลำไยกระป๋อง		ลำไยแช่แข็ง	
	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2553	216,395	3,513	72,705	2,109	14,166	510	211	16
2554	382,013	6,209	162,441	8,232	12,146	579	28	3
2555	455,663	8,454	129,255	3,783	11,472	602	29	4
2556	413,400	8,503	140,232	4,026	12,274	633	55	9
2557	410,000	9,500	170,000	4,700	12,000	600	40	6
อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	14.53	25.91	16.79	9.28	-316	4.23	-23.29	-8.27
2558*	414,000	9,700	174,000	4,800	12,000	600	70	8

หมายเหตุ: *ประมาณการ

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562, สื่อออนไลน์

ตาราง 2 การบริโภคภายในประเทศและการส่งออกลำไยสดและผลิตภัณฑ์ ปี 2553–2558

ปี	ปริมาณการบริโภคภายในประเทศ (ตัน)	การส่งออก	
		ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
2553	25,000	303,477	6,148
2554	35,000	556,328	15,024
2555	40,000	296,419	12,843
2556	45,000	565,961	13,172
2557	50,000	592,040	14,806
อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	17.79	14.49	17.66
2558*	50,000	600,070	15,108

หมายเหตุ: * ประมาณการ

ตาราง 3 เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ลำไย ปี 2553–2558

ปี	เนื้อที่ให้ผล (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม/ไร่)
2553	975,445	527,398	541
2554	990,456	780,580	788
2555	1,041,525	877,176	842
2556	1,038,108	854,616	823
2557	1,052,111	995,108	946
อัตราเพิ่ม (ร้อยละ)	2.00	14.57	12.31
2558*	1,061,128	991,624	934

หมายเหตุ: *ประมาณการ

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562, สื่อออนไลน์

ตาราง 4 เนื้อที่ยืนต้น เนื้อให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2562

รวมทั้งประเทศ /ภาค/จังหวัด	เนื้อที่ยืนต้น (ไร่)	เนื้อที่ให้ผลผลิต (ไร่)	ผลผลิต (ตัน)	ผลผลิตต่อเนื้อที่ให้ผล (กก./ไร่)
รวมทั้งประเทศ	1,201,678	1,169,496	1,011,276	865
ภาคเหนือ	884,254	862,497	626,921	727
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	28,706	27,704	11,198	404
ภาคกลาง	288,718	279,295	373,157	1,336
เชียงราย	139,771	137,221	58,364	425
พะเยา	60,782	56,888	21,021	370
ลำปาง	19,516	19,024	4,581	241
ลำพูน	270,189	269,924	231,026	856
เชียงใหม่	318,174	308,395	267,887	869
แม่ฮ่องสอน	550	469	199	424
ตาก	18,835	18,250	17,655	967
แพร่	4,550	4,348	936	215
น่าน	38,674	35,660	18,909	530

ที่มา: ศูนย์สารสนเทศการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562, สื่อออนไลน์

ลักษณะพฤกษศาสตร์และพันธุ์ลำไย

1. ลำต้น

มีขนาดลำต้นสูงปานกลางจนถึงขนาดใหญ่ ต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดจะมีลำต้นตรงเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่มีความสูงประมาณ 12–15 เมตร และถ้าหากเป็นต้นที่ขยายพันธุ์ด้วยการตอนกิ่ง จะแตกกิ่งก้านสาขาใกล้ ๆ กับพื้น และถ้าได้รับการตัดแต่งกิ่งในขณะที่ต้นยังเล็กมักแตกลำต้นเทียมหลายต้น ลำต้นที่เกิดขึ้นไม่ค่อยเหยียดตรง มักเอนหรือโค้งงอ เปลือก ลำต้นขรุขระมีสีเทาหรือสีเทาปนน้ำตาลแดง เป็นสะเก็ด (พาวิน มะโนชัย และคณะ, 2547)

2. ใบ

เป็นใบรวมที่ประกอบด้วยใบย่อยอยู่บนก้านใบร่วมกัน (pinnately compound leaves) มีปลายใบเป็นคู่มีใบย่อย 3–5 คู่ ความยาวใบ 20–30 เซนติเมตร ใบย่อยเรียงตัวสลับหรือเกือบตรงข้าม ความกว้างของใบย่อย 3–6 เซนติเมตร ยาว 7–15 เซนติเมตร รูปร่างใบเป็นรูปรีหรือรูปหอก ส่วนปลายใบและฐานใบค่อนข้างป้าน ใบด้านใบมีสีเขียวเข้มกว่า ด้านล่างสากเล็กน้อย ขอบใบเรียบไม่มีหยัก ใบเป็นคลื่นเล็กน้อย และเห็นเส้นแขนง (vein) แตกออกมาจากเส้นกลางใบชัดเจน และมีจำนวนมาก

3. กิ่งก้าน

จะแตกออกรอบต้นโดยต้นที่ปลูกด้วยเมล็ดจะแตกกิ่งล่างสุดสูงจากพื้นดิน ประมาณ 1–3 เมตร ส่วนต้นที่ปลูกจากกิ่งตอนจะแตกกิ่งล่างสุดต่ำกว่า คือ ประมาณ 0. 5–1 เมตร กิ่งก้านเปราะ และแตกกิ่งก้านสาขาดี ทำให้เบียดกันแน่น

4. ช่อดอก

ส่วนมากเกิดจากตาที่ปลายยอด (terminal bud) บางครั้งอาจเกิดจากตาข้างของกิ่ง ช่อดอกยาว ประมาณ 15–60 เซนติเมตร ช่อดอกขนาดกลางจะมีดอกย่อยประมาณ 3,000 ดอก

5. ดอก

มีสีขาวหรือขาวอมเหลือง มีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6–8 มิลลิเมตร มีกลิ่นหอม ช่อดอกหนึ่ง ๆ อาจมีดอก 3 ชนิด (polygamo–monoecious) ดอกตัวผู้ (staminate) ดอกตัวเมีย (pistillate flower) และดอกสมบูรณ์เพศ (perfect flower) ลักษณะที่คล้ายคลึงกันของดอกทั้ง 3 ชนิด คือ กลีบดอกบาง 5 กลีบ สีขาว กลีบเลี้ยงหนาแข็ง 5 กลีบ มีสีเขียวปนน้ำตาล

5.1 ดอกตัวผู้ (staminate flower) มีเกสรตัวผู้ 6–8 อัน เรียงเป็นชั้นเดียวกันบนจานรองดอก (disc) ซึ่งมีสีน้ำตาลอ่อน และมีลักษณะอุ้มน้ำ ก้านชูเกสรตัวผู้มีขน เกสรตัวผู้มีความยาวสม่ำเสมอ คือ ยาวประมาณ 3–5 มิลลิเมตร อับเรณูมี 2 หยัก และเมื่อแตกจะแตกตามยาว (longitudinal dehiscence)

5.2 ดอกกระเทย ที่ทำหน้าที่เป็นดอกตัวเมีย หรือดอกตัวเมีย (pistillate flower) ประกอบด้วย รังไข่ที่มี 2 พู (bicarpellate) ตั้งอยู่บนจานรองดอกเป็นแบบ (superior ovay) ด้านนอกของรังไข่มีขนปกคุลมอยู่ แต่ละพูจะมีเพียง 1 ช่อง (locule) เท่านั้น ที่จะเจริญเติบโตและพัฒนาจนเป็นผล ส่วนอีกพูหนึ่งจะค่อย ๆ ฝ่อ ในบางกรณีอาจผมไข่ทั้งสองเจริญจนเป็นผลได้ เกสรตัวเมีย (Style) ยาวประมาณ 2.5 มิลลิเมตร ตรงปลายยอดเกสร (stigma) แยกออกเป็น 2 แฉก เห็นได้ชัดเมื่อดอกบานเต็มที่ เกสรตัวผู้ มีประมาณ 8 อัน ก้านเกสรตัวผู้เป็นแบบ semi–sessile filament สั้นเพียง 1 มิลลิเมตร อับเรณูของเกสรตัวผู้จะไม่มีการแตกและไม่มีการงอก แต่จะค่อย ๆ แห้งตายไปหลังดอกบาน

5.3 ดอกสมบูรณ์เพศ มีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน รังไข่พองเป็นกระเปาะค่อนข้างกลม ขนาดเล็กกว่ารังไข่ของดอกเพศเมีย ยอดเกสรตัวเมียจะสั้นกว่า และตรงปลายจะแยกเพียงเล็กน้อยเมื่อดอกบาน ก้านชูอับละอองของดอกสมบูรณ์เพศจะมีความยาวสม่ำเสมอกัน คือ มีความยาวอยู่ระหว่าง 1.5–3.0 เซนติเมตร ดอกสมบูรณ์เพศสามารถติดผลได้ เช่นเดียวกับดอกตัวเมีย

6. ผล

ลำไยจะเริ่มติดผลหลังดอกบานประมาณ 2 สัปดาห์ รังไข่ทั้ง 2 พู เริ่มพัฒนาเป็นผล และขยายขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อมีขนาด 2-3 มิลลิเมตร รังไข่พูหนึ่งจะหยุดพัฒนาและเหี่ยวแห้งไป แต่รังไข่อีกพูหนึ่งพัฒนาเป็นผลเดี่ยวต่อไป ผลลำไยมีรูปร่างทรงกลมหรือทรงเบี้ยวขึ้นอยู่กับพันธุ์ เปลือกสีน้ำตาลอมเหลืองหรืออมเขียว ผลแก่มีเปลือกสีเหลืองหรือสีน้ำตาลอมแดง ผิวเปลือกเรียบหรือเกือบเรียบ มีตุ่มแบนปกคลุมที่ผิวเปลือกด้านนอก

7. เนื้อ

เกิดจากส่วนที่เจริญมาจากก้านไข่ (funiculus) เนื้อลำไยเป็นเนื้อเยื่อพาเรนไคมา ซึ่งเจริญเติบโตล้อมรอบเมล็ด (outer integument) มีลักษณะคล้ายวันสีขาวขุ่นหรือสีชมพูเรื่อ ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์

8. เมล็ด

มีลักษณะกลมจนถึงแบน เมื่อยังไม่แก่มีสีขาวแล้วค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีดำมัน ส่วนของเมล็ดที่ (dragon eye) นี้จะมีขนาดเล็กหรือใหญ่ต่างกันไปตามพันธุ์ เมื่อผลแก่จัด ถ้ายังไม่เก็บเกี่ยว placenta จะใหญ่ขึ้น เนื่องจาก placenta ดูดอาหารขึ้นไปเลี้ยงเมล็ด ทำให้เนื้อเยื่อมีรสชาติจืดลง นอกจากนี้ ลำไยยังสามารถแบ่งออกได้อีก 3 ลักษณะ ตามระยะเวลาในการติดดอกออกผล คือ

8.1 พันธุ์เบา ได้แก่ พันธุ์ดอ

8.2 พันธุ์ปานกลาง ได้แก่ พันธุ์แห้ว พันธุ์สีชมพู

8.3 พันธุ์หนัก ได้แก่ พันธุ์อีแดง เบี้ยวเขียว และพันธุ์พวงทอง

พันธุ์ที่ส่งเสริมในการปลูก

1. พันธุ์ดอ

เป็นพันธุ์เบา ทำให้ชาวสวนนิยมปลูกมากที่สุด เจริญเติบโตดี ยอดอ่อนมีทั้งยอดสีเขียวและสีแดง ลำต้นแข็งแรง เปลือกผลหนา ออกดอกติดผลค่อนข้างสม่ำเสมอ ทรงผลกลมแป้นและเบี้ยวยกบ่าข้างเดียว ผิวผลสีน้ำตาล มีกระหรือตาห่าง เนื้อค่อนข้างเหนียว สีขาวขุ่น เมล็ดใหญ่ปานกลาง

2. พันธุ์สีชมพู

เป็นพันธุ์กลางทรงพุ่มสูง โปร่ง กิ่งเปราะหักง่าย ออกดอกง่าย แต่ติดผลไม่สม่ำเสมอ ทรงผลค่อนข้างกลม ผิวสีน้ำตาลอมแดง เนื้อหนาปานกลาง นิ่มและกรอบ สีชมพูเรื่อ ๆ รสหวานและหอม เมล็ดค่อนข้างเล็ก

3. พันธุ์แห้ว

เป็นพันธุ์หนัก เจริญเติบโตดีมาก ยอดอ่อนมีทั้งสีแดงและสีเขียว ผลขนาดใหญ่ ทรงผลกลมและเบี้ยว ฐานผลบุ๋ม เปลือกสีน้ำตาลและหนา เนื้อหนา กรอบและล่อน รสหวานแหลมและหอม เมล็ดค่อนข้างเล็ก

4. พันธุ์เบี้ยวเขียว

เป็นพันธุ์หนัก เจริญเติบโตดี ทนแล้งได้ดี แต่อ่อนแอต่อโรคพุ่มไม้กวาด ออกดอกยาก และมักเว้นปี สามารถแบ่งเป็นเบี้ยวเขียวก้านแข็งและก้านอ่อน ผลมีขนาดใหญ่ ทรงผลกลมแบน เบี้ยว เปลือกสีเขียวอมน้ำตาลและหนา เนื้อหนา กรอบและล่อน รสหวานแหลมและหอม เมล็ดค่อนข้างเล็ก

5. พันธุ์เพชรสาคร

เป็นพันธุ์ทะวาย คือ ออกดอกมากกว่าหนึ่งครั้งต่อปี ใบมีขนาดเล็กและเรียวแหลม ผลกลม เปลือกบาง เนื้อสีขาวฉ่ำน้ำ รสหวาน

การปลูกลำไยและการดูแลรักษา

1. การเลือกพื้นที่ปลูกลำไย

1.1 การเลือกพื้นที่ ลำไยเป็นพืชที่เจริญเติบโตในดินแทบทุกชนิด แม้กระทั้งดินลูกรัง แต่ดินปลูกที่ให้ลำไยมีการเจริญเติบโตได้ดี คือ ดินร่วนปนทรายและดินตะกอน ซึ่งเกิดจากตะกอนดิน กรวด หิน ดิน ทราย อินทรีวัตถุที่น้ำพัดมาจะเกิดการทับถมของอินทรีย์วัตถุ สังเกตได้จากต้นลำไยที่ปลูกตามที่ราบลุ่มริมแม่น้ำปิง น้ำใต้ดินสูงในเขตจังหวัดลำพูน และเชียงใหม่ มีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตดี ดินปลูกลำไยควรมีค่าความเป็นกรดด่างของดิน (pH) อยู่ในช่วง 5.0–7.0 มีหน้าดินลึกระบายน้ำดี ดังนั้นก่อนทำการปลูกลำไยควรศึกษาคุณสมบัติของดิน เช่น โครงสร้างของดิน เนื้อดิน และความอุดมสมบูรณ์ของดิน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดการธาตุอาหารลำไยอย่างมีประสิทธิภาพ

1.2 แหล่งน้ำ น้ำเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของลำไยการผลิตลำไย เพื่อให้ได้คุณภาพ ต้องมีน้ำในปริมาณที่เพียงพอตลอดฤดูกาล นอกจากนี้ควรทำการศึกษาคุณสมบัติของน้ำและวิธีการจัดการน้ำที่มีประสิทธิภาพ เหมาะสำหรับการผลิตลำไย

1.3 สภาพภูมิอากาศ ปัจจัยสภาพภูมิอากาศที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของลำไย

1.3.1 อุณหภูมิ โดยทั่วไปลำไยต้องการอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 4–30 องศาเซลเซียส และต้องการอุณหภูมิต่ำ 10–22 องศาเซลเซียส

ในช่วงฤดูหนาว เดือนพฤศจิกายนถึงมกราคม เพื่อสร้างตาดอก ซึ่งในปีที่มีอากาศเย็นระยะเวลานานโดยไม่มีอากาศอุ่นแทรก ลำไยจะออกดอกติดผลดี แต่ถ้ามีอุณหภูมิไม่ต่ำพอ ต้นลำไยจะออกดอกน้อย หรือไม่ออกดอก

1.3.2 แสง การเจริญเติบโตของลำไยจำเป็นต้องได้รับแสงอย่างเพียงพอ ดังนั้นการปลูกลำไยจึงควรปลูกในที่โล่ง ในสภาพพื้นที่ที่มีปริมาณแสงน้อยซึ่งอาจเกิดจากการบังแสงของเมฆ หรือเกิดฝนตกติดต่อกันหลายวัน มักทำให้ต้นลำไยชะงักการเจริญเติบโต ส่วนในสภาพที่มีความเข้มแสงสูงมักเกิดปัญหาทำให้ผิวของผลลำไยเป็นสีน้ำตาลเข้มจำหน่ายได้ราคาตกต่ำ

1.3.3 ปริมาณน้ำฝนและความชื้นสัมพัทธ์ แหล่งปลูกลำไยควรมีปริมาณน้ำฝนอยู่ในช่วงประมาณ 1000–200 มิลลิเมตรต่อปี (พาวิน มะโนชัย และคณะ, 2547) และควรมีการกระจายของฝนประมาณ 100–150 วันต่อปี ในแหล่งปลูกที่มีปริมาณฝนตกน้อยควรจัดหาแหล่งน้ำและระบบชลประทานให้เพียงพอ และเหมาะสม

2. การเตรียมพื้นที่ปลูกลำไย

การเตรียมพื้นที่ปลูกในที่มีระดับน้ำใต้ดินสูง และมีน้ำท่วมขังเป็นครั้งคราว ควรมีการขุดรองนำดินมาถมเป็นแปลง ขนาดของแปลงนั้นขึ้นกับระยะปลูกขนาดของพื้นที่ปลูก เมื่อทำแปลงเสร็จแล้วก็รอให้ดินยุบตัวก่อนปลูกลำไย ระยะปลูกลำไยที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของดิน ควรปลูกลำไยที่มีระยะปลูกเหมาะสมและไม่ชิดเกินไป เพราะจะทำให้ทรงพุ่มชนกัน บริเวณนั้นไม่ออกดอกติดผลและเป็นแหล่งสะสมของโรคและแมลงอีกด้วย โดยทั่วไปแล้วระยะสำหรับพื้นที่จะชิดกว่าระยะปลูกในที่ดอน ระยะปลูกลำไยที่แนะนำ คือ ระยะปลูก 8x8 10x10 หรือ 12x12 เมตร ขนาดหลุมปลูกที่ชาวสวนเตรียมไว้ตั้งแต่ขนาด 50x50x50 เซนติเมตร จนถึงขนาด 100x100x100 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับสภาพและความสมบรูณ์ เช่น ดินดีดินรวนซุย มีอินทรียวัตถุสูง ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปลูกลำไย คือ ต้นหรือกลางฤดูฝน เพราะต้นที่ปลูกใหม่จะได้น้ำฝนอย่างสม่ำเสมอและเพียงพอในช่วงฤดูฝน ส่วนการปลูกในที่เป็นร่องแปลงทำได้ทั้งปี เพราะมีน้ำให้ต้นที่ปลูกอย่างเพียงพอ

3. การเลือกพันธุ์ปลูก

พันธุ์ที่นิยมปลูกกันมากที่สุดในปัจจุบัน คือ พันธุ์อีดอ รองลงมา ได้แก่ พันธุ์สีชมพู แห้ว และเบี้ยวเขียว การเลือกพันธุ์ที่จะนำไปปลูกนับว่าเป็นสิ่งสำคัญมาก จะต้องคัดเลือกกิ่งพันธุ์จากต้นที่ออกดอกติดผลสม่ำเสมอและปราศจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคพุ่มไม้กวาด ซึ่งโรคนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อไปกับกิ่งพันธุ์

4. วิธีปลูก

ส่วนใหญ่ปลูกด้วยกิ่งตอนซึ่งจะชำในชะลอมไม้ไผ่สาน ทางภาคเหนือ เรียกว่า “เป๊าะ” การปลูกจะขุดตรงกลางหลุมที่เตรียมไว้สึกประมาณ 1 ช่วงจอบ แล้ววางกิ่งพันธุ์ลง กลบดินให้แน่น ปักหลักกันลมโยก ในกรณีที่ชำกิ่งตอนลงถุงพลาสติกดำ จะต้องเอาถุงพลาสติกดำออกก่อน แล้วจึงนำกิ่งพันธุ์ลงปลูก

5. อายุเก็บเกี่ยว

ลำไยอายุตั้งแต่ 3 ปี จะเริ่มให้ผลผลิต และจะให้ผลเต็มที่เมื่ออายุ 7 ปีขึ้นไป ลำไยสามารถให้ผลผลิตได้มากกว่า 30 ปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการดูแลรักษา การตัดแต่งกิ่ง

6. ระยะเก็บเกี่ยว

ระยะเวลาตั้งแต่ออกดอกถึงเก็บเกี่ยวผลผลิต ประมาณ 6 เดือน ผลผลิตเฉลี่ยของลำไยที่โตเต็มที่ประมาณ 200 กิโลกรัม/ต้น ปริมาณของผลผลิตอยู่ระหว่าง 60–90 ผล/กิโลกรัม

7. ฤดูกาลเก็บเกี่ยว

ฤดูกาลเก็บเกี่ยวผลผลิต อยู่ระหว่างเดือนกรกฎาคม–เดือนสิงหาคม

8. การดูแลรักษา

8.1 การตัดแต่งกิ่ง

ต้นลำไยอายุ 1–3 ปี ซึ่งยังไม่ให้ผลผลิต ควรตัดแต่งให้ลำไยมีลักษณะทรงพุ่มเป็นทรงกลม ลำไยอายุ 4–5 ปี ให้ผลผลิตแล้ว ควรตัดแต่งกิ่งภายหลังเก็บเกี่ยวโดยตัดกิ่งกลางทรงพุ่มที่อยู่ในแนวตั้งเหลือตอกิ่ง เพื่อเปิดกลางทรงพุ่มให้ได้รับแสงสว่างมากขึ้น ลำไยอายุ 5–10 ปี ตัดแต่งกิ่งภายหลังเก็บเกี่ยว เพื่อไม่ให้ทรงพุ่มชนกัน ตัดแต่งเช่นเดียวกับลำไยอายุ 4–5 ปี ตัดปลายกิ่งทั้งแนวนอนและแนวราบให้มีความสูงเหลือเพียง 3 เมตร เพื่อสะดวกในการปฏิบัติดูแลรักษาสวนสำหรับลำไยที่ให้ผลผลิตแล้ว ควรตัดแต่งกิ่งแบบกิ่ง เว้นกิ่งเพื่อให้ลำไยออกดอกสม่ำเสมอทุกปี

8.2 การให้ปุ๋ย

ลำไยอายุ 5 ปี ขึ้นไป มีการใส่ปุ๋ยเคมีหลังเก็บเกี่ยวผลผลิต ใส่ปุ๋ย 15–15–15 ผสมกับ ปุ๋ย 46–0–0 อัตราส่วน 1:1 ต้นละ 2 กิโลกรัม กระตุ้นให้ลำไยแตกใบอ่อนเมื่อลำไยแตกใบอ่อนชุดที่ 2 ประมาณต้นเดือนกันยายน ใส่ปุ๋ย 15–1–15 ผสมกับปุ๋ย 46–0–0 อัตราส่วน 1:1 ต้นละ 2 กิโลกรัม ประมาณต้นเดือนตุลาคม กระตุ้นให้ลำไยมีใบแก่ พักตัวสะสมอาหาร เตรียมความพร้อมต่อการผ่านช่วงหนาวที่จะกระตุ้นให้ลำไยออกดอก ใส่ปุ๋ย 46–0–0 ผสมกับปุ๋ย 0–0–60 อัตราส่วน 1:1 ต้นละ 2 กิโลกรัม ในเดือนพฤศจิกายน ให้ปุ๋ยทางใบสูตร 0–52–34 อัตรา 150 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นให้ทั่วทรงพุ่มเพื่อไม่ให้ลำไยแตกใบใหม่เมื่อลำไยติดผล

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ย 15–15–15 ผสมกับปุ๋ย 46–0–0 อัตราส่วน 1:1 ต้นละ 1–1.5 กิโลกรัม เพื่อบำรุงผลให้เจริญเติบโตก่อนเก็บเกี่ยว 1 เดือน ใส่ปุ๋ย 0–0–60 อัตราต้นละ 1–2 กิโลกรัม เพื่อเพิ่มคุณภาพของผลผลิต

8.3 การให้น้ำ

8.3.1 วิธีการให้น้ำ

1) แบบใช้สายยางรด เป็นการให้น้ำที่ลงทุนต่ำแต่ต้องมีแหล่งน้ำเพียงพอ

2) แบบข้อเหวี่ยงขนาดเล็ก เป็นการให้น้ำในกรณีมีแหล่งน้ำจำกัด ต้นทุนสูงกว่าแบบแรก แบบน้ำหยด เหมาะสำหรับที่มีแหล่งน้ำจำกัดมาก ใช้ต้นทุนสูง

8.3.2 ปริมาณน้ำ

ช่วงฤดูแล้งหลังออกดอก เริ่มให้น้ำเมื่อลำไยมีดอกบานปฏิบัติ

1) สัปดาห์แรก ฉีดน้ำพรมที่กิ่งและโคนต้นเล็กน้อยเพื่อให้ลำไยค่อย ๆ ปรับตัว

2) สัปดาห์ที่สอง เริ่มให้น้ำเต็มที่ สำหรับต้นลำไยที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางทรงพุ่ม 7 เมตร ให้น้ำปริมาณครั้งละ 200–300 ลิตร ต่อต้น สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

9. การจัดการวัชพืช

การจัดการวัชพืชมีหลายวิธี เช่น การปลูกพืชคลุมดินซึ่งจะช่วยป้องกันการชะล้างหน้าดิน ช่วยรักษาความชื้น และเพิ่มความสมบูรณ์ให้กับดิน การตัดวัชพืชระหว่างแถวปลูกและระหว่างต้นลำไย ซึ่งอาจจะใช้สลับกับการพ่นสารกำจัดวัชพืชบ้าง โดยพ่นเพียงปีละครั้งเมื่อไม่สามารถตัดวัชพืชได้ทัน ด้วยเหตุผลเพราะขาดแรงงาน หรือสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมที่จะตัดวัชพืชได้ การรักษาบริเวณโคนต้นลำไยให้สะอาด ควรตัดวัชพืชให้สั้น ไม่ควรใช้จอบดายเนื่องจากเป็นอันตรายต่อระบบรากของลำไย และควรหลีกเลี่ยงการใช้สารกำจัดวัชพืชบริเวณใต้ทรงพุ่ม

10. การดูแลรักษาหลังการติดผล

ค้ำกิ่งโดยใช้ไม้ไผ่ค้ำกิ่งทุกกิ่ง เพื่อป้องกันกิ่งฉีกหัก เนื่องจากพายุลมแรง และกิ่งที่มีผลลำไยจำนวนมาก เมื่อมีโรคและแมลงศัตรูระบาดในระยะนี้ ควรฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดโรคและแมลงตามคำแนะนำ ในช่วงก่อนเก็บเกี่ยว 1 เดือน ควรห่อผลลำไยเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช เช่น ผีเสื้อมวนหวาน หนอนเจาะขั้ว ค้างคาว และเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีก่อนเก็บเกี่ยว เพื่อไม่ให้มีการตกค้างของสารเคมีในผลผลิตลำไย ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

โรคพืชของลำไย

1. โรคพุ่มไม้กวาด (Witches broom)

ลักษณะอาการ เหมือนพุ่มไม้กวาด ลำไยที่เป็นโรครุนแรงจะโทรม เมื่อออกดอกติดผลน้อย พันธุ์ลำไยที่อ่อนแอต่อโรคนี้เคยพบในพันธุ์เบี้ยวเขียว ก้านอ่อนที่ส่วนยอด และส่วนที่เป็นตา โดยเริ่มแรกใบยอดแตกใบออกเป็นฝอย มีลักษณะเหมือนพุ่มไม้กวาด ใบมีขนาดเล็กเรียวยาว ใบแข็งกระด้างไม่คลี่ออก กลายเป็นกระจุกสั้น ๆ ขึ้นตามส่วนยอด หากยอดที่เป็นโรคเมื่อถึงคราวออกช่อดอก ถ้าไม่รุนแรงก็จะออกช่อชนิดหนึ่งติดใบบนดอกและช่อสั้น ๆ ซึ่งอาจติดผลได้ 4–5 ผล ถ้าเป็นโรครุนแรงต้นจะออกดอกติดผลน้อย สาเหตุของโรคและการแพร่ระบาดเกิดจากเชื้อมายโคพลาสมา *Mycroplasma* แพร่ระบาดได้ทางกรรมพันธุ์ คือ สามารถแพร่ระบาดไปโดยการตอนกิ่งลำไยจากต้นที่เป็นโรค โรคนี้มีแมลงพวกเพลี้ย จักจั่นสีน้ำตาล เป็นพาหะนำเชื้อโรคไปสู่ต้นอื่น ๆ ได้

การป้องกันและกำจัด

1. คัดเลือกกิ่งพันธุ์จากต้นที่ไม่เป็นโรคไปปลูก

2. ป้องกันแมลงจำพวกปากดูดพวกเพลี้ยจั๊กจั่นสีน้ำตาล โดยใช้สารเคมี เช่น ฟอสซ์ อัตรา 50 ซีซี. ต่อน้ำ 20 ลิตร หรือมิพซิน อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือลอร์สแมน อัตรา 80 ซีซี. ต่อน้ำ 20 ลิตร

3. สำหรับต้นที่เป็นโรคถ้าเป็นไม่มาก ควรตัดกิ่งที่เป็นโรคนำมาเผาทำลายซึ่งชาวสวนจะต้องพร้อมใจกัน และกำจัดทุก ๆ สวน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อโรคแพร่ระบาด

2. โรคจุดสาหร่ายสนิม

ลักษณะอาการ ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดที่ใบ เกิดจุดค่อนข้างกลม มีขนาด 0.5–1 ซม. แรก ๆ เป็นขุยสีเขียวต่อมาในระยะเกิดสปอร์จะเป็นสีแดงสีสนิมเหล็ก ผิวมีลักษณะเป็นขุยคล้ายกำมะหยี่ เป็นที่ใบไม่รุนแรงมากนัก แต่ความรุนแรงจะปรากฏที่กิ่ง โดยเฉพาะถ้าเป็นมากก็จะทำให้ต้นทรุดโทรม กิ่งที่ถูกแสงจะถูกทำลายโดยเกิดเป็นขุยเช่นเดียวกับใบ จะเป็นจุดหรือเกิดต่อเนื่องเป็นขุยสนิมเหล็ก ต่อมาขุยก็จะแห้งหายไป จุดที่ถูกทำลายเปลือกจะแตกและแห้งทำให้ใบเหลืองร่วง แสดงอาการทรุดโทรม ทั้งนี้เป็นเพราะรากเทียมของสาหร่ายเข้าไปชอนไชในเนื้อเยื่อดูดกินน้ำเลี้ยงและเซลล์เน่าตาย ทำให้ส่วนนั้นแห้งตายไป

การแพร่ระบาด ทำลายพืชได้หลายชนิด ระบาดในที่ ๆ มีความชื้นสูง โดยเฉพาะในฤดูฝน แพร่ระบาดโดยสปอร์จะปลิว ไปตามลม นอกจากนี้ น้ำก็เป็นพาหะนำสปอร์ไปสู่ต้นอื่นได้เช่นเดียวกัน

การป้องกันและกำจัด_โดยการพ่นด้วยสารป้องกันกำจัดเชื้อรา พวกสารประกอบของทองแดง เช่น ค๊อปเปอร์ออกซีคลอไรด์ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

3. โรคราสีชมพู

ลักษณะอาการ ที่เกิดที่กิ่งโดยเฉพาะตรงง่ามของกิ่งหรือลำต้น กิ่งที่เป็นโรคใบจะปรากฏสีเหลืองซีด และเมื่อโรครุนแรงอาจทำให้ใบร่วงเหลือแต่กิ่ง บริเวณกิ่งที่ถูกทำลายจะมีคราบของเชื้อราสีขาวอมชมพู แผ่ขยายปกคลุมคล้ายทาด้วยสีชมพู เมื่อกิ่งแห้งจะเห็นคราบนี้ชัดขึ้นเป็นสีชมพูหรือสีปูนแห้ง เมื่อผ่าตรวจดูเปลือกจะผุ เนื้อไม้ยุ่ยและกิ่งแห้งตายไปในที่สุด ทั้งนี้ เพราะเกิดคล้ายรากเทียมที่ใต้ผิวแผ่นเชื้อราที่แนบติดกับผิวของกิ่ง เข้าดูดกินน้ำเลี้ยงและทำลายเนื้อเยื่อบริเวณนั้น สาเหตุของโรคและการแพร่ระบาด เกิดจากเชื้อรา *Corticium salmonicolor* ระบาดในฤดูฝน สปอร์ของเชื้อราระบาดไปกับลมและน้ำฝน โดยเฉพาะกิ่งล่างมักจะถูกเชื้อรานี้เข้าทำลาย เกิดเป็นโรคอยู่ทั่วไป ทรงพุ่มที่หนาทึบย่อมจะช่วยส่งเสริมให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคนี้ได้มากและเร็วขึ้น

การป้องกันและกำจัด ควรตัดแต่งกิ่งเป็นโรคออกไปเผา เพื่อลดปริมาณเชื้อโรค และให้มีการถ่ายเทอากาศดีขึ้น แล้วพ่นด้วยสารเคมีตรงส่วนที่เป็นโรค ด้วย คอปเปอร์ออกซี-คลอไรด์ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร หรือเอดิเฟนฟอส 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

4. โรคราดำ

ลักษณะอาการ ทำลายของแมลงพวกปากดูด เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย แล้วถ่ายน้ำหวานมาปกคลุมส่วนต่าง ๆ ของลำไย เชื้อราที่มีอยู่ในอากาศโดยเฉพาะเชื้อรา *Capnodium ramosum, Meliola euphoriae* จะปลิวมาขึ้นบนส่วนที่มีน้ำหวาน สีดำของเชื้อราขึ้นปกคลุมใบ กิ่ง ช่อดอก และผิวของผล ทำให้เห็นเป็นคราบสีดำคล้ายเขม่าบนใบที่ถูกเคลือบด้วยแผ่นคราบดำของเชื้อรานี้ เมื่อแห้งจะเห็นออกเป็นแผ่นได้ง่าย เชื้อราไม่ได้ทำลายพืชโดยตรงแต่ไปลดการปรุงอาหารของใบ อาการที่ปรากฏที่ช่อดอกถ้าเป็นรุนแรงทำให้ดอกร่วงไม่สามารถผสมเกสรได้ จึงเป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้ดอกร่วงเพราะถูกเชื้อราดำเข้ามาเคลือบ สาเหตุของโรคและการแพร่ระบาด เกิดจากผลของการทำลายของแมลงพวกปากดูด ที่ดูดกินส่วนอ่อนของลำไย แล้วถ่ายน้ำหวานมาปกคลุมส่วนต่าง ๆ ของลำไย เชื้อราที่มีอยู่ในอากาศโดยเฉพาะเชื้อราจะปลิวมาขึ้นบนส่วนที่มีน้ำหวานที่แมลงขับถ่ายออกมาแล้วเจริญเป็นคราบสีดำ แมลงปากดูดเท่าที่พบ เช่น เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย เพลี้ยจั๊กจั่น และเพลี้ยอ่อน เป็นต้น

การป้องกันและกำจัด กำจัดแมลงพวกปากดูดดังกล่าว โดยพ่นสารเคมี เช่น คาร์บาริล 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร อาจพ่นควบคู่กับสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น คอปเปอร์-ออกซิคลอไรด์ หรือไซฟลูธริน 40–50 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร

การดูแลรักษาลำไย

การปฏิบัติดูแลรักษาในช่วงที่ลำไยออกดอก ควรให้น้ำและปุ๋ยอย่างพอเพียง ถ้าต้นลำไยขาดน้ำและธาตุอาหาร ก็เป็นสาเหตุทำให้การติดผลน้อยได้เช่นกัน การเจริญเติบโตของผลการเติบโตของผลลำไยเป็นแบบซิกมอยด์ เคิร์ฟ (sigmoid curve) สำหรับพันธุ์อีดอใช้เวลาในการเติบโตจากระยะติดผลถึงโตเต็มที่ประมาณ 21 สัปดาห์ (ดาวเรือง ศรีกอก, 2530) แบ่งการเติบโตของผลลำไยออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ติดผลจนถึงสัปดาห์ที่ 10 จะมีการเติบโตอย่างช้า ๆ เป็นการเจริญเติบโตของเปลือกและเมล็ด ส่วนเนื้อผลเริ่มเกิดเมื่อผลอายุประมาณ 6 สัปดาห์ และมีการเจริญเติบโตอย่างช้า จนถึงสัปดาห์ที่ 14 ในขณะที่เมล็ดใช้เวลาตั้งแต่ติดผลถึงสัปดาห์ที่ 8

ระยะที่ 2 เริ่มตั้งแต่หลังสัปดาห์ที่ 10–21 หลังติดผล ระยะนี้ผลลำไยจะมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนของเนื้อผลจะเจริญอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 14 จนกระทั่งถึงสัปดาห์ที่ 21 การเจริญของเนื้อจะคงที่ ส่วนเมล็ดจะเจริญรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 8–14 หลังจากนั้นขนาดของเมล็ดจะโตเกือบเต็มที่

ระยะที่ 3 ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 21 เป็นต้นไป เป็นระยะที่มีการเติบโตของผลช้าลงเนื่องจากส่วนเนื้อและเมล็ดมีการเจริญเกือบคงที่ ขนาดผลลำไยที่ปลูกเป็นการค้าของไทยโดยทั่วไปจะมีขนาดของผลอยู่ในช่วง 2.5–3.5 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามขนาดของผลขึ้นอยู่กับพันธุ์ สภาพแวดล้อมและการปฏิบัติ–ดูแลรักษา การใช้ GA3 ความเข้มข้น 50 มก/ล. ในระยะตั้งแต่ดอกบาน ถึง 4 สัปดาห์หลังดอกบาน สามารถเพิ่มขนาดของผลได้ 17.7% (กิติโชติ จันทร์ศรีตระกูล, 2537) ในกรณีที่ต้นลำไยติดผลมาก เมื่อผลลำไยมีขนาดเท่ากับเมล็ดถั่วเหลืองทำการปลิดผลออกสามารถเพิ่มขนาดของผลได้อย่างชัดเจน การแตกของผล ผลแตก (fruit cracking) เกิดจากความไม่สมดุลของการขยายตัวของส่วนเนื้อและส่วนเปลือก เนื้อผลซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์อ่อนนุ่ม (spongy parenchyma) มีความสามารถในการยืดหดตัวได้สูงในขณะที่เปลือกมีความยืดหยุ่นต่ำกว่า ในกรณีที่เนื้อผลมีการขยายปริมาตรอย่างรวดเร็ว และเร็วกว่าการขยายตัวของเปลือก แรงดันที่เกิดจากการขยายของขนาดของเนื้อผล ถ้ามีมากพอก็จะดันให้เปลือกผลแตก การแตกของผลลำไยมักเกิดในระยะที่ผลลำไยใกล้จะแก่ และพบว่าการแตกของผลส่วนใหญ่เกิดกับต้นลำไยที่ติดผลดก ผิวเปลือกบาง การป้องกันการแตกของผลอย่าให้ลำไยติดผลดก และให้น้ำอย่างสม่ำเสมอ ตั้งแต่ระยะออกดอกถึงผลแก่ ส่วนธาตุอาหารที่คาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการแตกของผล คือ ธาตุแคลเซียม

โรคผลแตกผลลายในลำไย

โรคของลำไยที่สำคัญ ได้แก่ โรคพุ่มแจ้ หรือโรคพุ่มไม้กวาด (wiches'broom) สาเหตุอาจเกิดสารพิษของไรลำไย (*Aceria dimocarpi*) หรืออาจเกิดเชื้อไฟโตพลาสมา (phytoplasma) โรคใบจุดดำของลำไย (black spot of longan leaf) เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum sp.* โรคยอดไหม้ใบไหม้ของลำไย (longan apical and leaf blight) เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Mycelia sterilia*, โรคกิ่งปม (gall desease) คาดว่าเกิดจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Agrobacterium sp.* โรคใบจุดสนิมหรือโรคใบจุดสาหร่าย (algal leaf spot) เกิดจากเชื้อรา *Cephaleuros virescens*, ไลเคนส์ตามใบ กิ่ง และลำต้น (lichens on longan leaf, branch and trunk) โรคผลเน่าสีน้ำตาล เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* โรคราดำ (sooty mold of longan) เกิดจากเชื้อรา *Meliola euphoria* และ *Capnodium ramosum* โรคหงอย เกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การขาดอาหาร น้ำ รวมทั้งสภาพการขาดการดูแล และอาจจะมีไส้เดือนฝอยศัตรูพืชเข้าทำลายร่วมด้วย (จริยา วิสิทธิพานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง, 2545)

ในปี พ.ศ. 2543 เริ่มพบว่า ลำไยที่ปลูกในเขต อำเภอโป่งน้ำร้อน อำเภอสอยดาว มีอาการเปลือกผลแตกเน่าเมื่อใกล้เก็บเกี่ยว และระบาดทำความเสียหายมากขึ้นในปี พ.ศ. 2544 เบื้องต้นเกษตรกรเข้าใจว่าเกิดจากเชื้อราไฟทอฟทอร่า (*Phytophthora* sp.) เข้าทำลายเนื่องจากมีกลุ่มเส้นใยของเชื้อราสีขาวบริเวณรอยแตก และลุกลามลงสู่ผลที่อยู่ด้านล่างของช่อ อาการผลแตกจะเกิดกับลำไยใกล้เก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับผลผลิตลำไยที่จะเก็บเกี่ยวระหว่างช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มีฝนตกชุกจะมีความชื้นสูง ผลผลิตลำไยได้รับความเสียหายมากกว่า 60% ในบางพื้นที่ผู้ซื้อไม่กล้าซื้อลำไยล่วงหน้า เนื่องจากผลผลิตลำไยที่ได้น้อยกว่าที่คาดการณ์ไว้มาก

การศึกษาสาเหตุของอาการเปลือกแตกและผลเน่าของลำไย ในเขตอำเภอสอยดาว อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี มีลักษณะอาการทั่วไป สามารถแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะ ดังนี้

1. อาการเปลือกแตกจะเกิดที่จุดแผลของผลลำไยก่อน จะมีสีเทาดำ ขนาดประมาณ 2–4 มิลลิเมตร ด้านในจะเห็นจุดดวงสีน้ำตาลหรือสีดำ ขนาดใหญ่กว่าด้านนอก จึงเรียกลำไยผิวลาย ทำการแยกเชื้อ พบเชื้อราที่น่าจะเป็นสาเหตุดังกล่าว 3 ชนิด คือ *Brotryodiplodia* sp., *Phomophsis* sp. และ *Pestalotiopsis* sp. ลักษณะอาการจุดแผลบริเวณเปลือกผล ไม่น่าจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลแตกรุนแรง แต่อาจจะเป็นสาเหตุให้ผลแตก เมื่อนำผลลำไยที่มีจุดแผลเข้าอบแห้ง นอกจากนี้ได้พบเชื้อราหลายชนิดทั้งที่เป็น parasite และ saprophyte ได้แก่ *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp. และ *Fusarium* sp. เชื้อราที่กล่าวมาจะเป็นเชื้อราที่ทำลายภายหลังที่ผลแตก และมีน้ำหวานไหลออกมาแล้ว

2. อาการแตกที่เกิดจากจุดแผล อาจจะเกิดจากการทำลายของแมลงบางชนิด เช่น มวนลำไย หนอนเจาะขั้ว แมลงวันทอง เป็นต้น ทำให้เกิดแผลที่เปลือกของผลลำไย ทำให้เซลล์บริเวณนั้นตาย แต่เปลือกส่วนอื่นยังขยายต่อได้

3. อาการเปลือกผลแตกจากด้านขั้วผลมายังด้านล่างผล รอยแตกส่วนใหญ่จะเห็นเป็นคราบสีน้ำตาลเข้ม เนื้อผลจะดันออกมาข้างนอกของรอยแตก มีน้ำหวานไหลออกมาและมีเชื้อราหลายชนิดขึ้นปกคลุมบริเวณรอยแผลและขั้วผล อาการลักษณะนี้ มักจะเกิดกับลำไยผลแก่ใกล้เก็บเกี่ยว พบมากกับลำไยที่ปลูกในเขต อำเภอสอยดาว และอำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี

และนอกจากนี้ ผลของการฉีดพ่นปุ๋ยและฮอร์โมนพืชบางชนิดทางใบมากเกินความจำเป็นจะมีส่วนช่วยทำให้ผลลำไยมีอัตราการแตกสูงขึ้น เพราะเกิดการขยายตัวของเนื้อผลและเปลือกผลไม่สมดุลกัน ซึ่งเนื้อลำไยจะประกอบด้วยเซลล์ที่มีการยืดหดตัวสูง ส่วนเปลือกผลลำไยจะแข็งยืดหดตัวได้ต่ำกว่า จึงไม่สามารถรองรับปริมาณการขยายตัวของส่วนเนื้อได้ ส่วนของเนื้อผลจึงดันให้เปลือกแตกออก ประกอบกับผลลำไยที่เกิดจากเร่งให้ออกดอกติดผลทุกปี และมีจำนวนผลต่อช่อสูงมาก ดังนั้นผลลำไยจึงมีเปลือกบางกว่าปกติ ทำให้ผลแตกง่ายขึ้น การให้ปุ๋ยหวานฉีดพ่นทางใบเพื่อเพิ่มคุณภาพของผล ปุ๋ยหวานดังกล่าวจะมีปริมาณธาตุโปแตสเซียมสูง ซึ่งผลของการที่ให้ธาตุโปแตสเซียมสูงขณะที่ผลยังอ่อนอยู่ ทำให้เกิดการชักนำให้มีการย้ายน้ำตาลเข้าไปในเนื้อผล เป็นผลทำให้ส่วนของเนื้อผลมีความเข้มข้นสูงมาก ทำให้เนื้อผลขยายและดันเปลือกให้แตกได้ พบว่า ลำไยที่ปลูกในเขตจังหวัดจันทบุรี จะมีอาการเปลือกแตก ผลเน่าอัตราสูงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม โดยเฉพาะกับลำไยพันธุ์อีดอ ซึ่งมีเปลือกบางกว่าพันธุ์อื่น (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

มีรายงานว่าโรคผลลาย ผลแตก และผลร่วง แพร่ระบาดอย่างรุนแรงในปี พ.ศ. 2544 ในแหล่งปลูกลำไยที่สำคัญของจังหวัดเชียงใหม่ ที่อำเภอสันทราย หางดง สันป่าตอง จอมทอง และฮอด ส่วนในจังหวัดลำพูน พบที่อำเภอเมือง แม่ทา และลี้ และพบโรคนี้ในระดับรุนแรงเช่นกัน ในพื้นที่ที่มีการขยายการปลูกลำไยอย่างรวดเร็ว ในภาคตะวันออกของประเทศ คือ ที่อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี บริเวณเพาะปลูกดังกล่าว บางสวนทำความเสียหายมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ การผลิตลำไยในปัจจุบัน มีการใช้ปัจจัยทางการผลิตมากมาย ไม่ว่าจะเป็นปุ๋ยอาหารเสริม ฮอร์โมน หรือสารชีวภาพหลาย ๆ ชนิด ซึ่งวิธีการใช้ก็จะมีทั้งฉีด พ่นใส่ใบ ดอก หรือผลของลำไย แต่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้เมื่อนำไปใช้แล้วอาจจะไม่ได้ผลอย่างที่โฆษณาไว้ หรือมากไปกว่านั้นอาจทำให้เกิดผลเสียต่อการผลิตลำไยได้ คือ ทำให้ลำไยแสดงอาการผลลาย ผลแตก หรือผลร่วง ก่อนเก็บเกี่ยวได้ เพราะสารบางชนิดเป็นอาหารของเชื้อรา เมื่ออาหารเหล่านี้ไปเกาะติดกับผิวเปลือกของลำไย ทำให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตบนผลลำไยได้ โดยเชื้อรา

จะใช้อาหารในการเจริญเติบโต รวมถึงทำลายเนื้อเยื่อผล ทำให้ผิวเปลือกเป็นสีน้ำตาล พอผลลำไยมีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อผิวลำไยปริแตก และบริเวณขั้วลำไยอาจถูกทำลายทำให้เกิดอาการผลร่วงได้ โดยส่วนใหญ่แล้วอาการเหล่านี้มักจะเกิดขึ้นในฤดูฝน เพราะน้ำฝนทำให้เปลือกลำไยเปียกชื้น และมีสปอร์ของเชื้อราปลิวอยู่ในอากาศ อย่างไรก็ตามสามารถป้องกันและกำจัดอาการเหล่านี้ได้ (สารานุกรม, 2559, สื่อออนไลน์)

นอกจากนี้ ยังมีการรายงานผลการวิจัยถึงอาการทางกายภาพของลำไยที่แตกเกิดจากการที่เปลือกลำไยขยายตัวไม่ทันการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเนื้อลำไย ซึ่งสาเหตุแท้จริงเกิดจากการที่ผลลำไยที่กำลังเจริญเติบโตนั้น ผ่านสภาพแล้ง อุณหภูมิสูง หรือขาดน้ำก่อน จากนั้นจึงได้รับน้ำในปริมาณมากทันที หรือเกิดจากการฝนขาดช่วง ได้รับน้ำไม่สม่ำเสมอ จึงทำให้เกิดการแสดงอาการผลแตกและหลุดร่วงได้ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอาการผลแตกของลำไยประกอบด้วย สภาพแวดล้อมภายนอก คือ สภาพภูมิอากาศที่แปรปรวน เช่น แล้งแล้วกระทบฝน หรือฝนขาดช่วง หรือการจัดการน้ำที่เหมาะเหมาะสม เช่น ให้น้ำไม่สม่ำเสมอ เป็นต้น และสภาพแวดล้อมภายในต้นลำไยเอง โดยมักจะพบว่าเฉพาะต้นลำไยที่ติดผลดก ลูกมีขนาดเล็กและเปลือกบาง มักจะถูกชักนำจากสภาพแวดล้อมให้แสดงอาการผลแตกได้ง่ายและมากกว่าต้นที่ติดผลปานกลางหรือน้อย ปัญหาลำไยผลแตกดังกล่าว เมื่อเกิดขึ้นแล้วไม่สามารถแก้ไขได้ วิธีการที่ดีที่สุด คือ การป้องกัน ซึ่งได้แก่ การให้น้ำลำไยอย่างสม่ำเสมอและเพียงพอ หากพบว่าลำไยติดผลดกอาจจะต้องทำการตัดแต่งช่อผลออกบ้าง เพื่อให้ลำไยสามารถเลี้ยงลูกได้ การดูแลเรื่องธาตุอาหารเสริมโดยเฉพาะแคลเซียม อาจจะช่วยลดความเสียหายที่อาจจะเกิดกับสวนลำไยได้ (พาวิน มะโนชัย และคณะ 2547; ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, 2553)

การประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบโรคพืช

ในปัจจุบันเทคนิคทางชีวโมเลกุลมีการพัฒนามากขึ้นมีการประยุกต์ใช้หลายด้านในการวิเคราะห์จีโนม ซึ่งแต่ก่อนเป็นการศึกษาจำนวนรูปร่างของโครโมโซมหรือเป็นการศึกษาจำนวนชุดโครโมโซม โดยการย้อมสีแล้วตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Jeffreys, Wilson and Thein, 1985) แต่ในปัจจุบันมีการนำเอาดีเอ็นเอใช้เป็นเครื่องหมาย (DNA marker) ทำให้การวิเคราะห์จีโนม เป็นไปได้อย่างรวดเร็ว สามารถศึกษาได้ทั้งส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน และเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง มีลักษณะทางพันธุ์กรรมเหมือนกัน จึงสามารถศึกษาได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ไม่ขึ้นกับระยะของการเจริญเติบโต และอวัยวะใด

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางด้านดีเอ็นเอ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เทคนิคดังกล่าวอาศัยการจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอ เพื่อหาสาเหตุของโรคอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความรวดเร็ว แม่นยำ และความจำเพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิคทางด้านเซรุ่มวิทยา (Seal and Elphinstone, 1994)

โดยเทคนิคทางด้านดีเอ็นเอจะอาศัยเครื่องมือ คือ polymerase chain reaction (PCR) หรือปฏิกริยาลูกโซ่จำลองตัว เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นในหลอดทดลอง ด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่อง โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยาร่วมกับการใช้ primer ที่จำเพาะ ซึ่ง primer คือ สายนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวท่อนสั้น ๆ มีขนาดประมาณ 20–30 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสในดีเอ็นเอต้นแบบ โดยคร่อมบริเวณยีนหรือส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน 2 เส้น ที่มีทิศทางในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเข้าหากัน เป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอเส้นใหม่ขึ้นมา เอนไซม์ DNA polymerase นำนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (A, T, C, G) มาต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอ โดยใช้ primer เป็นจุดเริ่มในการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับเบสเรียงตามเบสที่เป็นคู่สมกัน บนเส้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) เทคนิค PCR พัฒนาขึ้นมาเมื่อประมาณปี ค.ศ. 1985 โดย Kary Mullis นักชีวเคมีของบริษัท Cetus Corporation เพื่อใช้ในการจำแนก specific DNA sequence ใน สารละลายที่มีกลุ่มของ sequence DNA เป็นจำนวนมากปะปนกันอยู่ แล้วเพิ่มปริมาณส่วน targeted sequence นี้ขึ้นมาเป็นล้านเท่า โดยผ่านวิธีกึ่งอัตโนมัติ ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 หรือ 2 ชั่วโมง เท่านั้น (พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, 2540) หลักการและเทคนิค PCR มีองค์ประกอบพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการทำ PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single–stranded DNA template) คือ เส้นดีเอ็นเอที่มีบริเวณส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณอยู่ ซึ่งดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นใหม่จะจำลองตัวตามดีเอ็นเอต้นแบบ primer คือ ดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวเส้นสั้น ๆ ที่เป็นคู่สมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ด้านปลาย 3’ของ ดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างสายดีเอ็นเอที่ต้องการ dNTPs (deoxy–nuclrotide triphosphate) คือเบส A, T, C, G ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของสายดีเอ็นเอ, เอนไซม์ DNA polymerase คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสายดีเอ็นเอ มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถทนความร้อนสูง (93–95 องศาเซลเซียส) ได้เครื่อง PCR (thermalcycler) คือ เครื่องเปลี่ยนอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาแบบต่อเนื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ (เพชรรัตน์ ศิริวงศ์, 2545) นอกจากนี้ ยังมีเทคนิคที่อาศัยหลักการของเทคนิค PCR เช่น เทคนิค RAPD (Rapid Amplified Polymorphic DNA) วิธีนี้ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลทางพันธุกรรมมาก่อน ไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสนั้นจะเป็นชนิดที่มีขนาดสั้น

ประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random amplification) จากนั้นจึงแยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ผ่านอะกาโรสเจล (agarose gel) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบ ศึกษาตำแหน่งและจำนวนแถบเพื่อดูความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ ข้อควรระวังของ RAPD คือ แถบดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (PCR product bands) ที่เกิดขึ้นดูเหมือนมีขนาดเท่ากันแต่ความจริงแล้วถึงแม้ขนาดเท่ากันจริง แต่เป็นชิ้นดีเอ็นเอคนละชนิดกัน เลยทำให้แปลผลคลาดเคลื่อนได้ วิธีแก้ปัญหา คือ เพิ่มจำนวนไพร์เมอร์ให้มากขึ้น เพื่อยืนยันผลการทดลอง หรือบางครั้ง PCR products ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อยมาก จนแถบดีเอ็นเอไม่ปรากฏให้เห็นหรือเห็นได้ลาง ๆ ทำให้ผู้ทดลองคิดว่าไม่มี PCR products เกิดขึ้น แก้ปัญหาโดยการปรับเปลี่ยนสภาพหรือความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (Gavidia, Castillo and Perez–Bermudez, 1996) เทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยโรคพืช โดยสามารถใช้ตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณน้อยในพืชได้ และยังเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ เฉพาะเจาะจง และมีความไวสูง (sensitive) ซึ่ง วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์ และคณะ (2541) ได้ทำการตรวจหา *Ralstonia solanacearum* ที่ปนเปื้อนในดินและต้นมะเขือเทศ ด้วยเทคนิค PCR โดยการใช้ primer เพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายขนาด 705 bp สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้จากดิน 6 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 8 ตัวอย่าง นอกจากนี้ Botha, et al (2001) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และ nested–PCR ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรค bacterial blight ในองุ่น พบว่าสามารถใช้ในการตรวจสอบได้

ในปัจจุบันมีรายงานการใช้เทคนิค Loopmediated amplification (LAMP) ในการตรวจสอบเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเป็นเทคนิคที่อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อ เช่น การนำมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบในเชื้อ *Phytophthora spp.* (Notomi, et al., 2000; Nakao, et al., 2010) เทคนิคนี้จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสภาวะอุณหภูมิ 60 และ 65°C ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูง ยิ่งกว่านั้นเทคนิค LAMP ยังใช้สารเคมีที่สามารถเก็บได้ที่อุณหภูมิ 37°C ในระยะเวลา 1 เดือน จึงง่ายต่อการเก็บรักษา (Thekisoe, et al., 2009) นอกจากนี้เทคนิคดังกล่าวยังสามารถนำมาวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ที่ใช้ SYBR ซึ่งสามารถตรวจได้จากการสังเกตสี (Niu, et al., 2012) และเทคนิคนี้สามารถนำไปตรวจสอบในสภาพแปลงทดลอง เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เช่นการใช้ LAMP technology ในการตรวจสอบเชื้อ *Phytophthora spp.* (Dai, et al., 2012) เชื้อ *P. ramorum* และ *P. kernoviae* (Tomlinson, Dickinson and Boonham, 2010) โดยสามารถตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคได้ในปริมาณน้อย โดยสามารถวิเคราะห์ได้ในระดับ 10 pg μL^{-1} (Dai, et al., 2012; Martin, et al., 2012) ซึ่งมีรายงานในการประยุกต์ใช้เทคนิคดังกล่าว

ทั้งในเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา (Pan, et al., 2011; Parida, et al., 2004; Niessen and Vogel, 2010)

หลักการของเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

หลักการของเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) (ธงชัย แก้วพินิจ และคณะ, 2013) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการของการเพิ่มขยายจำนวนของสารพันธุกรรม โดยใช้เวลาในการทดสอบน้อยกว่าการทำด้วย PCR พบว่า สามารถเพิ่มขยายได้ถึง 10^9 เท่าในเวลาที่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และการเพิ่มปริมาณ DNA ต้องใช้ primers 4 ชุด หรือ 6 ชุด ที่จำเพาะต่อกับสาย DNA ต้นแบบ (DNA template) 6 ตำแหน่ง จึงทำให้มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบสูง Primers ของวิธีการ LAMP ประกอบไปด้วย outer primers (F3 และ B3) มีความยาวประมาณ 17-21 base pairs (bp) และ inner primers (FIP = forward inner primer, BIP = backward inner primer) โดยที่ FIP ประกอบด้วย F1c กับ F2 และ BIP ประกอบด้วย B1c กับ B2 ปฏิกิริยาของ LAMP จะทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ปฏิกิริยาของ LAMP ประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ 1) LAMP initial step, 2) LAMP cycling step, 3) elongation and recycling step

1. LAMP initial step ปฏิกิริยาของ LAMP ไม่จำเป็นต้อง denature จาก double strand DNA เป็น single strand DNA เหมือนเทคนิค PCR เนื่องจากเอนไซม์ Bst ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 60-65˚C และทำหน้าที่แยก DNA สายคู่ เป็นสายเดี่ยวได้ (strand displacement) โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง กระบวนการสังเคราะห์เริ่มต้นการเพิ่มขยายที่อุณหภูมิ 60-65˚C inner FIP primer ด้าน F2 จะเข้าจับกับ F2c และทำการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' ของ primer F2 จากนั้น F3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง F3c แล้วทำการสังเคราะห์โดย DNA polymerase จะทำการแยกสาย FIP-link complementary strand ซึ่งสายนี้จะเกิดการ form เป็น loop ที่ปลาย 5' โดยเกิดจาก F1c จับกับ F1

2. LAMP cycling step เริ่มจาก inner primer BIP ด้าน B2 จะเข้าจับกับ B2c และทำการสังเคราะห์ที่ปลาย 3' ของ B2 primer จากนั้น B3 primer เข้ามาจับในตำแหน่ง B3c แล้วทำการสังเคราะห์โดย DNA polymerase ทำการแยกสาย BIP-link complementary strand ซึ่งสายนี้จะเกิดการ form เป็น loop ที่ปลาย 5' โดยเกิดจาก B1c จับกับ B1 ซึ่งการเกิด loop ของด้าน FIB และ BIP จะเรียกว่า dumb-bell

3. Elongation and recycling step เป็นปฏิกิริยาที่เกิดซ้ำในขั้นตอนที่ 1 และ 2 ทำให้ได้ dumb-bell ที่ต่อกันหลายข้อ สามารถเกิด cycle amplification step) ด้านปลายของ loop forward ก่อน

คือ สามารถมี self primed strand displacement DNA synthesis สร้าง DNA จาก F1 ต่อไปเรื่อย ๆ จนถึง B1c ขณะเดียวกัน FIP primer ก็สามารถ hybridize กับ F2c ที่ loop forward สร้าง DNA สายใหม่ ได้จำนวน copies เพิ่มมากขึ้น และมี stem loop แบบ dumb–bell ที่สามารถเกิด cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ การทำงานจะต่อเนื่องกันตลอดเวลา ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้มาก 109–1010 copies ภายในเวลา 15–60 นาที ดังนั้นจึงทำให้ปฏิกิริยาที่ได้จาก LAMP ได้ product ที่เกิดขึ้นมีได้หลายขนาด ในขั้นตอน gel electrophoresis วิธีการนี้จะให้ผลตรวจที่ดี ควรจะเลือกขนาดของ DNA เป้าหมายน้อยกว่า 300 bp

ในการติดตามปฏิกิริยา พบว่า product ที่เกิดจากการสังเคราะห์ขึ้นด้วยวิธีการ LAMP แล้วจะเกิดจากการจับกันของ pyrophosphate ion กับ magnesium ion เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน magnesium pyrophosphate จะทำให้เกิดตะกอนสีขาวขุ่นไม่ละลายน้ำ ซึ่ง pyrophosphate เป็น product ที่ปล่อยออกมาระหว่างการสังเคราะห์สารพันธุกรรม ตะกอนดังกล่าวสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า 6, 7 หรือการยืนยันผลการตรวจเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometry แม้กระทั่งการติดตามด้วยสารฟลูออเรสเซนต์ได้ นอกจากการพัฒนาดังที่กล่าวมาแล้วนั้น (Nagamine, et al., 2000) ได้แสดงให้เห็นว่า ปฏิกิริยา LAMP ไม่จำเป็นต้องแยกสาย (denature) DNA แม่แบบก่อนทำการเพิ่มปริมาณ DNA และยังอธิบายถึงกรรมวิธีสำหรับการเพิ่มความเร็วในการตรวจสอบด้วยการเพิ่ม loop primer เข้าไปจับตรงบริเวณ stem loop ทั้งสองข้างของ dumb–bell โดยไม่ให้ซ้อนทับกับ inner primer ทำให้ปฏิกิริยานั้นเกิดได้เร็วยิ่งขึ้นกว่าครึ่งหนึ่งของเวลาที่ทำด้วยวิธีการ LAMP ปกติ เนื่องด้วยการเพิ่ม loop primers จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพให้สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น

ข้อดีของเทคนิคLAMP

1. มีประสิทธิภาพในการเพิ่มขยายยีนได้สูง ภายใต้สภาวะ เดียวกันที่อุณหภูมิประมาณ 60–65 องศาเซียลเซียส มีความไวสูงในการตรวจจับ DNA สามารถตรวจจับ DNA จำนวนน้อย ๆ ได้ถึง 6 copies ในการตรวจหาเชื้อไวรัส เทคนิค LAMP มีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10–100 เท่า

2. LAMP มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ specific sites ถึง 6 ตำแหน่ง โดยใช้ primers ถึง 4 เส้น ดังนั้นจะช่วยลด background จากการเพิ่มขยายยีนที่ไม่จำเพาะได้

3. เป็นเทคนิคที่ง่ายในการทดสอบ ถ้าสามารถสร้าง primer ที่เหมาะสมได้ใช้เครื่องมือพื้นฐานทั่ว ๆ ไป เช่น อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ หรือ heat block

4. การตรวจวัดผลการทดสอบง่าย ไม่ยุ่งยาก และสามารถเลือกวิธีการตรวจวัดได้ ปัจุบันสามารถวัดแบบ real time ได้

การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

การตรวจเชื้อ Squash leaf curl Yunnan virus ในพืชวงศ์แตงด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SLCuYV-TH-PK-2016 (KX388157) มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer Explorer version 4สำหรับการตรวจสอบด้วยวิธี LAMP ชุดไพรเมอร์ออกแบบให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย คือ AC1 (Rep gene) โดยไพรเมอร์มีความจำเพาะกับ 6 ตำแหน่งของยีนเป้าหมาย หนึ่งชุดไพรเมอร์ประกอบด้วย 4 เส้น คือ B3, F3, BIP และ FIP โดยมีลำดับเบสของ ไพเมอร์ดังนี้ SLCuYV-B3 5´GGCAAAAAATATCTTTCTCACTT 3´,SLCuYV-F35´CTGGGGTTTCTGAACTGG3´, SLCuYV-BIP5´TGTCAGATGGACATGAAATGTTTTG-CCCAAAATGCCCATTACCA 3´,SLCuYV-FIP 5´ TCAGAGTATCACAAGAAAAACACCA CTTTGAATTGGATGAGC องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาการตรวจเชื้อ Squash leaf curl Yunnan virus ด้วยเทคนิค LAMP การตรวจเชื้อ SLCuYV ด้วยเทคนิค LAMP ดัดแปลงวิธีการมาจาก Kuan, et al. (2010) มีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังนี้ การทำปฏิกิริยา LAMP ปริมาตร 25 µl ประกอบด้วย 0.4 µM SLCuYV-B3, 0.4 µM SLCuYV-F3, 6.4 µM SLCuYV-BIP, 6.4 µMSLCuYV-FIP, 1.4 mM dNTPs ,1 M Betaine(Sigma-Aldrich), 1X Thermo buffer, 8U Bst DNApolymerase large fragment (Biolabs®) และ 5mM MgSO4 แล้วเติม 1 µl ของดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยมีการเกิดปฏิกิริยาได้เมื่ออุณหภูมิประมาณ 65 °C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 90 °C นาน 2 นาที หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยาตรวจผลบน 1.5% agarose gelelectrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100โวลต์ นาน 40 นาที และสังเกตผลด้วยตาเปล่า หรือเติมสาร SYBR® Green I (Invitrogen, USA) (1:10) 1.5 µl ซึ่งสามารถพบการเปลี่ยนสีจากสีตั้งต้นของสาร SYBR Green I ซึ่งเป็นสารสีส้มเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวเรืองแสงได้ในหลอดที่เกิดปฏิกิริยา การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา LAMP ตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา LAMP ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบฟักทองที่แสดงอาการใบหงิก เหลือง ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ใบลดรูป ต้นเตี้ยแคระ และให้ผลบวกกับแอนติบอดีต่อเชื้อ TYLCV จากการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ดีเอ็นเอฟักทองปลอดโรค ดีเอ็นเอมะเขือเทศปลอดโรค และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวอย่างควบคุม โดยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 °C นาน 2 นาที และใช้องค์ประกอบสารต่าง ๆ ดังแสดงข้างต้น ตรวจสอบผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ยืนยันความถูกต้องโดยส่งวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LAMP product (First Base Laboratories Sdn.Bhd., Selangor, Malaysia) ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดประมาณ 200-500 bp นำมาศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของสายพันธุ์เชื้อไวรัสที่ตรวจได้ด้วยโปรแกรม BLAST นำไปเปรียบเทียบข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

การทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP เปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจยืนยันว่ามีเชื้อ SLCuYV ที่ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น 134 ng/µl นำมาเจือจางเป็น 10 เท่าตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-6} แล้วใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา LAMP และใช้องค์ประกอบต่าง ๆ ตามข้อ 3 ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 นาที ตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน AC1 คือ AC1–F 5´ TCAACTCTCCGTCG TCTGAT3´ และ AC1–R 5´ ATGCCACGCACAAACCAC 3' และใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่วัดค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอที่นำมาเจือจางตั้งแต่ 134 ng/µl, 134 ng/µl x 10^{-1}, 134 ng/µl x 10^{-2}, 134 ng/µl x 10^{-3}, 134 ng/µl x 10^{-4}, 134 ng/µl x 10^{-5} และ 134 ng/µl x 10^{-6} เช่นเดียวกับเทคนิค LAMP มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ดังนี้ ปริมาตรรวม 25 µl ,2X master mix PCR reaction (Promega, Madison, USA) 12.5 µl, เติมไพรเมอร์ AC1–F และ AC1–R ความเข้มข้น 10 µM อย่างละ 1.25 µl และ เติมดีเอ็นเอต้นแบบ 1 µl ทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ pre–denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 3 นาที จำนวน 20 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis (รุ่งทิพย์ จั่นเพ็ชร และคณะ, 2560)

การพัฒนาการประเมินความเฉพาะเจาะจง และประสิทธิภาพความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรขมิ้นชันและขิง จะเก็บตัวอย่างเชื้อรา Aspergillus flavus และ Aspergillus paracificus จากห้องปฏิบัติการ จำนวน 100 ตัวอย่าง ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนที่พบในเชื้อราทั้งสองชนิดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนอะฟลาทอกซินของเชื้อรา Aspergillus flavus และ Aspergilius paraciticus ถูกออกแบบจากลำดับเบสในธนาคารยีน (genebank) ได้ทั้งหมด 4 ตัว คือ ALFA_RF3 5GCAACCTGATGACGACTGAT–3 ALFA_RB3 5–GCAACCTGATGACGACTGAT–3 ALFA_RBIP 5CAAGTAGCCATCCTGCGCGC– GGAACAAGAGGGCTACCGA– 3 ALFA_RBIP 5–ATCGTTCTCAAGGTGCTGGCA–CCGTTGAGGTACACTGGGT–3 ทดสอบประสิทธิภาพความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification ที่พัฒนาขึ้นผลการศึกษา พบว่า สามารถตรวจสอบยีนสร้างอะฟลาทอกซินตามความเข้มข้นต่าง ๆ เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนได้ คือ ความเข้มข้นที่เจือจางจากปริมาณตั้งต้นไป 10^{7} พบว่า เทคนิค LAMP อาศัยไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ที่จำเพาะต่อยีนสร้างอะฟลาทอกซิน 6 บริเวณ และเพิ่มปริมาณได้ด้วยอุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เพียงอุณหภูมิเดียวภายในเวลาไม่เกิน 1 ชั่วโมง เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพความไวที่ความเข้มข้นเจือจาง 10 เท่า มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้าง

อะฟลาทอกซินจำนวน 100 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับเทคนิค ELISA และเมื่อนำเทคนิค LAMP ไปตรวจวิเคราะห์หาเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรขมิ้นชันและขิง พบว่า ผลิตภัณฑ์ขิง จำนวน 20 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin จำนวน 4 ตัวอย่าง ส่วนผลิตภัณฑ์ขมิ้นชัน จำนวน 6 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อรา จำนวน 3 ตัวอย่าง

การพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในขมิ้นชันและขิงในครั้งนี้ เกิดปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 60 นาที ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียว ให้ความเฉพาะเจาะจงสูงกว่าเทคนิค ELISA ซึ่งอุณหภูมิเดียวก็สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างรวดเร็ว จึงเป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อรา Aspergillus สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ภาคสนาม จึงสามารถทำการตรวจได้ทุกที่ โดยเทคนิคเดิมอยู่บนหลัก polymerase chain reaction (PCR) จะต้องอาศัยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน 2 ถึง 3 ระดับ จึงต้องพึ่งพาเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ รวมทั้งทักษะของผู้ทำการตรวจวิเคราะห์ จึงไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้ เทคนิค LAMP มีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อในระดับที่สูงกว่าเทคนิค PCR และ ELISA เนื่องจากอาศัยไพรเมอร์ 2 คู่ ซึ่งจะเพาะต่อยีนเป้าหมาย 6 บริเวณ ผลการตรวจวิเคราะห์ที่สัมพันธ์กันระหว่างเทคนิค LAMP และเทคนิค ELISA ยิ่งทำให้เทคนิคนี้ควรนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรอื่น ๆ รวมทั้งการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่มีผลเสียต่อสุขภาพในอนาคต (ภัทรา พลับเจริญสุข และปัณรสี สู่ศิริรัตน์, 2556)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สาเหตุของโรคผลลายของลำไย และการป้องกันกำจัด (Causal Agents of Longan Fruit Discoloring and Its Control Measure) จากการสำรวจโรคผลลายของลำไยในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และจันทบุรี พบถึงการระบาดที่อำเภอพร้าว และอำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่ อำเภอป่าซาง จังหวัดลำพูน อำเภอสอยดาว และอำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ทำให้ผลผลิตลำไยเกิดการเสียหาย จากลักษณะอาการผลลายของลำไย พบว่ าที่ผิวของผลลำไยมีจุดสีดำ บางจุดมีขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วผล ทำให้ลำไยมีสีลายกระ แกะดูข้างในผลมีจุดสีดำเกิดขึ้นบริเวณผิวเปลือกด้านในด้วย และเมื่อนำผลที่เป็นโรคมาแยกเชื้อสาเหตุ พบเชื้อราทั้งหมด 5 ชนิด คือ *Pestalotiopsis* sp. และเชื้อราที่ยังไม่ทราบชื่ออีก 4 ชนิด เมื่อนำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท จึงได้ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับผลลำไย ในสภาพสวน พบว่า เชื้อราไอโซเลทที่ (unknown 5) ทำให้เกิดอาการผลลายเป็นจุดสีดำ และมีเส้นใยของเชื้อราปกคลุม บางผลเกิดอาการผลแตก โดยอาการจะเกิดภายใน 72 ชั่วโมง หลังการปลูกเชื้อ การทดลองเพื่อหาปัจจัยที่ทำให้เกิดอาการ

ผลลาย โดยจะทำการพ่นสารชีวภาพและสารกำจัดเชื้อราชนิดต่าง ๆ ฉีดพ่นผลลำไยเมื่อมีขนาดผลประมาณ 14–22 มิลลิเมตร พบว่า ไม่ทำให้เกิดอาการผลลาย ผลแตก แต่พบว่าน้ำสกัดจากหอยเชอรี่ ซัคคารีน โพลีซัคคาไรด์ และน้ำสกัดจากสาหร่ายธรรมชาติ ทำให้สีผิวของผลลำไยเมื่อสุกแก่มีสีคล้ำขึ้นมาก และขนาดของผลนั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกรรมวิธีทำการทดลอง การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลลาย พบว่า สารกำจัดเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ unknown 5 ได้ 100% คือ benomyl 50%WP carbendazim 50% WP procymidone 50% WP tebuconazole 25%EW difenoconazole 25%SC และ carbendazim 50%WP+benomyl 50%WP ขณะที่ procymidone 50%WP และ tebuconazole 25%EW สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ไอโซเลท จากจันทบุรีได้ 100% การทดสอบประสิทธิภาพของสารกำจัดเชื้อราในสภาพสวน พบว่า ไม่สามารถนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกันได้ เนื่องจากไม่มีการระบาดของโรค จากการศึกษา พบว่า มีเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับพืชชนิดอื่น ซึ่งมีลักษณะเส้นใยคล้ายเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลลาย คือ เชื้อราที่แยกจากโรคผลเน่าของมะม่วง ฝรั่ง โรคใบไหม้ของลำไย และ *Rhizoctonia solani* จากข้าว จึงนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับลำไย พบว่า เชื้อราที่แยกจากมะม่วง และฝรั่ง ไอโซเลทที่ 2 สามารถทำให้ลำไยเกิดอาการผลลาย ผลแตก เมื่อได้นำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กัน โดยศึกษาแบบไอโซไซม์ของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผลลายในลำไย และเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยใช้ไอโซไซม์ esterase พบว่า เชื้อราทั้งหมดมีความแตกต่างกัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารกำจัดเชื้อราต่อการควบคุมโรคผลลาย ผลแตก และผลร่วงของลำไยในห้องปฏิบัติการ การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคผลลาย ผลแตกในลำไย Unknown 5 และ isolate จันทบุรี ด้วย *B. subtilis* จาก stock culture จำนวน 45 ไอโซเลท ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และที่แยกจากส่วนต่าง ๆ ของลำไย จำนวน 32 ไอโซเลท พบว่า ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย ผลแตกในลำไยได้ ส่วนผลการใช้ *B. subtilis* ที่อยู่ในรูปแบบของผงสำเร็จรูป พบว่า ที่ความเข้มข้นที่แนะนำต่ำที่ 50% ต่ำกว่าอัตราแนะนำ 25% พบว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา isolate จันทบุรี ได้ 55–62% แต่ยังมีผลยับยั้งต่อ Unknown 5 ค่อนข้างต่ำ 20–40% เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อรา *Trichoderma* sp. พบว่า เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคผลลายผลแตก ที่ Unknown 5 ได้ 72% ส่วนไอโซเลท จันทบุรี ยับยั้งได้ 75% (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีกำจัดเชื้อรา โรคผลลาย ผลแตก ของลำไย ในห้องปฏิบัติการ และในสภาพสวน จากการทดสอบสารกำจัดเชื้อราในห้องปฏิบัติการ พบว่า สารกำจัดเชื้อรา 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ benomyl 50%, WP carbendazim 50% WP, procymidone 50% wp, tebuconazole 25% EW, difenoconazole 25% SC และ carbendazim 50% WP+ benomyl 50% WP สามารถยับยั้ง 100 ในการกำจัดเชื้อรา ที่พบไอโซเลท 5 ที่พบในภาคเหนือ ส่วนเชื้อที่พบในจังหวัดจันทบุรี พบว่า procymidone 50% wp และ tebuconazole 25% EW สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 100 ในการทดสอบในสภาพสวน ที่อำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี พบว่า ไม่มีเชื้อระบาดในลำไย (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องแก้ว

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องเขย่า (Shaker)

1.2 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical A lance)

1.3 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar Air Flow)

1.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

1.5 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

1.6 ตู้เย็น (Refrigerator)

1.7 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

1.8 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate)

1.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

1.10 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

1.11 เครื่องรันเจล (Electrophoresis tank and Power supply)

1.12 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermo Electron Corporation รุ่น Px_2)

1.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

1.14 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer)

1.15 ไมโครปิเปต (Micro pipette)

1.16 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope)

1.17 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

2. เครื่องแก้ว

2.1 แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ (Microscope Slide and Cover Slide)

2.2 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

2.3 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

2.4 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

2.5 บีกเกอร์ (Glass Beaker)

2.6 หลอดทดลอง (Test Tube)

2.7 หลอดทดลองฝาเกลียว (Test Tube with Screw Cap)

2.8 ขวดเก็บสารละลาย (Media Bottle)

3. อุปกรณ์อื่น ๆ

3.1 ที่วางหลอดทดลอง (Test Tube Rack)

3.2 ปากคีบ (Forceps)

3.3 ลูกยางสามทาง (Rubber Pipette Filler)

3.4 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.6 สำลี (Absorbent Cotton Wool)

3.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.8 Cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm.

3.9 ด้ามมีด และใบมีดผ่าตัด (Scalpel Handle and Blades Surgical)

3.10 หลอดปั่นแยกปลอดเชื้อ ขนาด 1.5 ml (Micro test tubes)

3.11 หลอดสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Reaction Tube)

3.12 พาราฟิล์ม 4IN×125FT Roll

3.13 ถุงพลาสติก

3.14 กล่องพสาสติก

4. สารเคมีที่ใช้

4.1 Ethanol

4.2 น้ำกลั่น

4.3 10% Sodium Hypochlorite (Chlorox)

4.4 Lacto phenol Cotton Blum

4.5 ชุดสีย้อมสปอร์ Lactophenol cotton blue

4.6 Immersion oil

4.7 Potato starch

4.8 Agar

4.9 สารเคมี/สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ คือ

4.9.1 Genejet Genomic Purification Kit

4.9.2 Deionized distilled water

4.10 สารเคมี/สารละลายสำหรับการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ

4.10.1 10X PCR Buffer

4.10.2 $MgCl_2$

4.10.3 10mM dNTPs Mix

4.10.4 สารละลาย 16S rDNA primer

4.10.5 Tag DNA polymerase

4.10.6 สารละลาย Template DNA

4.10.7 Deionized water (RNase free water)

4.11 สารละลาย/สารเคมีสำหรับการทำ Electrophoresis คือ

4.10.1 สารละลาย PCR product

4.10.2 6X loading dye

4.10.3 Generuler 1 kp plus DNA ladder (invitrogen™)

4.10.4 Agarose gel

4.10.5 1X TBE

4.10.6 สารละลาย Ethidium bromide (EtBr)

4.12 สารละลาย/สารเคมีสำหรับการทำ Loop–mediated Isothermal Amplification

4.12.1 1 ul สารสกัดดีเอ็นเอ

4.12.2 40 pmol ของไพเมอร์ FIP และ BIP

4.12.3 20 ng template DNA

4.12.4 8 units *Bst* DNA polymerase

4.12.5 10× ThermoPol buffer

4.12.6 25 mM dNTPs

4.12.7 5 M betaine (Sigma, St. Louis, MO)

4.12.8 50 mM $MgSO_4$, 2% Tween 20

4.12.9 1 μL 50 μM calcein–500 μM MnCl2.

5. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

6. พืชที่ใช้ในการทดสอบ

ลำไยสายพันธุ์อีดอ อายุ 10 ปี เก็บตัวอย่างในพื้นที่บ้านต๋ำ จังหวัดพะเยา ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่าง คือ ระยะออกดอกถึงเก็บเกี่ยว เป็นเวลา 7 เดือน

ขั้นตอนและวิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลายเพื่อนำมาวิเคราะห์สาเหตุโรค

ทำการสำรวจโรคผลลาย ในแหล่งปลูกลำไยโดยเฉพาะพื้นที่ที่เคยมีการระบาดรุนแรงมาก่อน เปรียบเทียบกับบริเวณที่ไม่เกิดโรคผลลาย โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่บ้านต๋ำ จังหวัดพะเยา โดยทำโดยแผนที่โดยใช้แผนที่ดาวเทียมจาก https://maps.google.co.th/19.2426966,99.755702 โดยศึกษาข้อมูลการระบาดขอโรคเพิ่มเติม เพื่อใช้ในสุ่มเลือกจุดศึกษาเพื่อทำแผนที่สำรวจโรคผลลาย ในแหล่งปลูกลำไยของจังหวัดพะเยา ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลาย โดยทำการเก็บตัวอย่างเก็บตัวอย่างมาศึกษาลักษณะอาการของโรคที่ชัดเจน ใส่ถุงพลาสติก เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์อาการ พร้อมทั้งบันทึกภาพ โดยใช้วิธีประยุกต์ของ ชาตรี สิทธิกุล และคณะ (2547) โดยทำการสำรวจแปลงลำไยที่ได้ทำการคัดเลือกไว้ โดยสำรวจและเก็บข้อมูลต่าง ๆ โดยเก็บข้อมูลอาการความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับลำไย

ภาพ 1 แผนที่แปลงลำไยของเกษตรกรบ้านต๋ำ อ.เมือง จ.พะเยา

2. การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) เป็นการศึกษาการเข้าทำลายของศัตรูพืช เช่น แมลงปากดูด หรือการมีเชื้อสาเหตุโรคอยู่บริเวณเนื้อเยื่อของพืชที่แสดงอาการของโรค ซึ่งอาจช่วยให้สามารถวินิจฉัยยืนยันสภาพการติดเชื้อ และยังทำให้ทราบถึงลักษณะรูปร่าง สัณฐานวิทยา โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อลำไยมาตรวจเพื่อยืนยันผล ภายใต้กล้อง scanning electron microscope (SEM) ดังนี้ ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรคผลลายของลำไย ตัดบริเวณแผลเดี่ยวเป็นชิ้นเล็ก ๆ ให้คาบเกี่ยวระหว่างเนื้อเยื่อลำไยที่แสดงอาการของโรค และเนื้อเยื่อปกติ จำนวนตัวอย่างละ 5 ชิ้น ใช้เทคนิคการคงสภาพเนื้อเยื่อด้วยสารเคมี 2 ชนิด (Double Fixation) ใช้ glutaraldehyde สำหรับการคงสภาพเนื้อเยื่อครั้งแรก และ osmium tetroxide จากนั้นขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วย ethyl alcohol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเริ่มจากความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ไปหาความเข้มข้นสูง เมื่อขจัดน้ำออกจากตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจึงทำตัวอย่างให้แห้ง (Drying) ด้วยเทคนิคการทำให้ตัวอย่างแห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical Point Drying) โดยนำเข้าเครื่อง Critical Point Dryer เมื่อได้ตัวอย่างที่แห้งและคงลักษณะรูปร่าง นำตัวอย่างที่แห้งแล้ว ไปติดบนแท่นวางตัวอย่าง โดยใช้วัสดุในการเชื่อมติดตัวอย่างกับแท่นวางตัวอย่าง จากนั้นนำไปเคลือบโลหะ ตัวอย่างควรมีความหนาประมาณ 10–20 นาโนเมตร แล้วจึงนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป (อรัญญา ตันติปัญจพร, 2534)

3. การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเชื้อ สูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งให้เย็นและผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างลำไยที่เก็บมาจากสวนที่เกิดการระบาด มาแยกหาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค (tissue transplant) โดยตัดเปลือกผลของลำไยบริเวณขอบแผล (บริเวณกึ่งกลางของส่วนเนื้อเยื่อที่ปกติและเป็นโรค) ให้ได้ขนาด 1x1 เซนติเมตร จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 2–3 นาที แล้วย้ายชิ้นพืชแช่ใน Clorox 10% เป็นเวลา 3–4 นาที จากนั้นย้ายลงในน้ำกลั่น 1 นาที แล้วซับด้วยกระดาษทิชชูที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นพืชวางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) (Riker and Riker, 1963) จานละ 4 ชิ้น บ่มเชื้อ (incubation) ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1–2 วัน ให้เชื้อราเจริญออกมาจากชิ้นพืช จากนั้นสะกิดปลายเส้นใยของแต่ละ colony ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) และเก็บเชื้อราไว้ในหลอดอาหารแบบเอียง ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) โดยสะกิดปลายเส้นใยของแต่ละ colony

มา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จนกระทั้งนำไปทดลอง

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (วิจัย รักวิทยาศาสตร์, 2551) โดยเทคนิคการเลี้ยงบนสไลด์ (slide cultured technique) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ได้จากการคัดแยกโดย subculture โคโลนีเชื้อราบริสุทธิ์ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเชื้อสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งให้เย็นและผิวหน้าอาหารแห้ง ตัดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจาน ให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัส กว้างด้านละประมาณ 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำ PDA ที่ตัดแล้ววางบนสไลด์ที่วางลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแท่งสำลีที่ผ่านการนึ่งฆ่า แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยเชื้อรามาแตะที่ส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของชิ้นวุ้น แล้วนำกระจกปิดสไลด์ที่วางปิดชิ้นวุ้น บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7 วัน นำมาเตรียมทำสไลด์ถาวร หรือกึ่งถาวร โดยยกกระจกปิดสไลด์ขึ้น แล้วหยดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ลงตรงกลางกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยเชื้อรา เพื่อให้เอทานอลกระจายเข้าสู่เส้นใยเชื้อรา จากนั้น นำไปวางบนสไลด์เปล่า หยดด้วย Lactophenol cotton blue การศึกษาการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงบนสไลด์ด้วยตาเปล่า และภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นอกจากนี้เมื่อราเจริญยังสามารถนำ cover slip ดังกล่าวไปทำสไลด์กึ่งถาวรได้อีกด้วย เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป (เอกพันธ์ บางยี่ขัน, 2547)

5. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการคัดแยกเชื้อราสาเหตุโรคในข้อ 3 แล้วนำเชื้อราต่าง ๆ ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค Koch's postulation (Brock and Brock, 1978) เพื่อหาเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง โดยปลูกเชื้อ (inoculation) บนผลลำไย โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.1 การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการ

เตรียมผลลำไยเพื่อใช้ในการทดสอบ คัดเลือกหาเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการผลลายในระดับห้องปฏิบัติการ โดยลำไยที่คัดเลือกมานั้น มาจากสวนของเกษตรกร ตำบลบ้านต๊ำ ที่ไม่มีการแพร่ระบาดของโรคผลลาย ทำการคัดเลือกลำไยที่นำมาทดสอบ โดยที่ผิวของลำไยจะต้องไม่มีร่องรอย และจะต้องไม่มีอาการของโรคผลลาย จากนั้นทำการตัดผลลำไยให้เหลือก้านยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มาล้างฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสำลีที่แช่ด้วยสารละลายเกลือมาตรฐาน (NaCl 0.85%) มาพันบริเวณก้านลำไยที่ถูกตัด จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาทดสอบโดยใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยเชื้อแล้ววางบนผลลำไย ผลละ 1 ชิ้น ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 12 ผล สังเกตลักษณะอาการของโรคผลลายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Control)

ที่วางด้วยชิ้นอาหาร PDA จากนั้นนำไปบ่มเชื้อเป็นเวลา 3–5 วัน โดยวางในกล่องพลาสติกชั้น สังเกตดูอาการบนผลลำไย เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยใช้สูตรในการคำนวณ (นิรุต เทียมเพชร, 2556) คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = [จำนวนลูกลำไยที่เกิดโรค/จำนวนลำไยทั้งหมด] X 100 โดยทำการเปรียบเทียบแต่ละชุดการทดลองกับชุดควบคุม และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS statistics และคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (Duncan)

5.2 การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคในสภาพแปลงทดลอง

คัดเลือกหาเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการผลลายในระดับแปลงปลูก เมื่อได้เชื้อราที่แยกจากอาการผลลายแล้วนำเชื้อราต่าง ๆ ไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนแปลงปลูก เพื่อหาเชื้อสาเหตุโรคที่แท้จริง โดยทดสอบเชื้อบนผลลำไยในแต่ละช่อ ก่อนทำการทดสอบเชื้อก่อโรค เลือกสุ่มช่อลำไยโดยสุ่มเลือกช่อที่มีจำนวนผลประมาณ 20 ผล/ช่อ จากนั้นพ่นด้วย alcohol 70% ลงบนผลลำไย ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเตรียมเชื้อราโดยขูดสปอร์ที่เจริญบนอาหารให้สัมผัสกับน้ำ แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยที่มีเชื้อราผสมอยู่ นับจำนวนสปอร์ ด้วย Heamocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ spore/ml นำเชื้อราแต่ละเชื้อมาฉีดพ่นบนผลลำไย ปริมาณ 10 มิลลิลิตร/ช่อ เชื้อละ 5 ช่อ โดยแยกต้นกัน (1 เชื้อ/1 ช่อ/1 ต้น) เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า จากนั้นใช้กระดาษฟางที่ชุ่มน้ำ ห่อผลลำไยทั้งช่อแล้วคลุมด้วยถุงพลาสติก เพื่อเป็นสภาพเก็บรักษาความชื้น (moist chamber) ติดฉลาก (label) สังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนผลลำไยเมื่อครบ 7 วัน มาเปิดถุงพลาสติกดูอาการบนผลลำไย เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยใช้สูตรในการคำนวณ (นิรุต เทียมเพชร, 2556) คือ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค = [จำนวนลูกลำไยที่เกิดโรค/จำนวนลำไยทั้งหมด] X 100 โดยทำการเปรียบเทียบแต่ละชุดการทดลองกับชุดควบคุม และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS statistics และคำนวณค่าทางสถิติ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (Duncan)

6. การหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไย

6.1 การเตรียมการเตรียมดีเอ็นเอของเชื้อรา

ทำการสกัด Genomic DNA ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผลลายในลำไย โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Thermo Scientific Genejet Genomic Purification Kit ในการสกัด โดยมีวิธีการตามลำดับ ดังนี้

6.1.1 ทำการเลี้ยงเชื้อสาเหตุโรคบนอาหารแข็งสูตร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3–7 วัน

6.1.2 ขูดเส้นใยเชื้อราลงไปในสารละลาย Digestion Solution ปริมาตร 180 μL และสารละลาย Proteanase K ปริมาตร 20 μL จากนั้นนำไป Incubate 56 °C 1 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันเบา ๆ พลิกทุก ๆ 10 นาที

6.1.3 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย RNase A Solution ปริมาตร 20 μL ผสมกันที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Lysis solution ปริมาตร 200 μL ผสมให้เข้ากัน

6.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่ 25 °C แล้วดูดเอาส่วนบน (Supernatant) ใส่ Eppendorf Tube ใหม่

6.1.5 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย 50% Alcohol ปริมาตร 40 μL ผสมกันเข้าขึ้นลงแล้วใส่ใน column centrifuge ด้วยความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่ 25 °C เทส่วนใสทิ้งแล้วประกอบใหม่

6.1.6 ใช้ไมโครปิเปตดูด washing I 500 μL ใส่ลงไปใน GeneJEI spin column โดยไม่ให้เปื้อนบริเวณขอบของ column ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่ 25°C เสร็จแล้วถอด spin column ไปใส่ใน collection tube อันใหม่

6.1.7 ใช้ไมโครปิเปตดูด washing II 500 μL ใส่ลงไปใน GeneJEI spin column โดยไม่ให้เปื้อนบริเวณขอบของ column ปิดฝาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ที่ 25°C เสร็จแล้วเททิ้ง ถอด spin column ไปใส่ใน micro test tube อันใหม่

6.1.8 ใช้ไมโครปิเปตดูด Elution Buffer ปริมาตร 25 μL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

6.1.9 ใช้ไมโครปิเปตดูด Elution Buffer ปริมาตร 25 μL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บไว้ที่ –20 °C

6.1.10 นำสารละลายดีเอ็นเอ ไปตรวจวัดปริมาณ และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel หรือวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 nm แล้วนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ต่อไป

6.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราก่อโรคโดยใช้เทคนิค PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราที่สกัดได้โดยเครื่อง Thermo Electron Corporation รุ่น Px_2 เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ ITS4 และ ITS5 ของเชื้อรา โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อรา มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ universal primer คือ ไพเมอร์ ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)

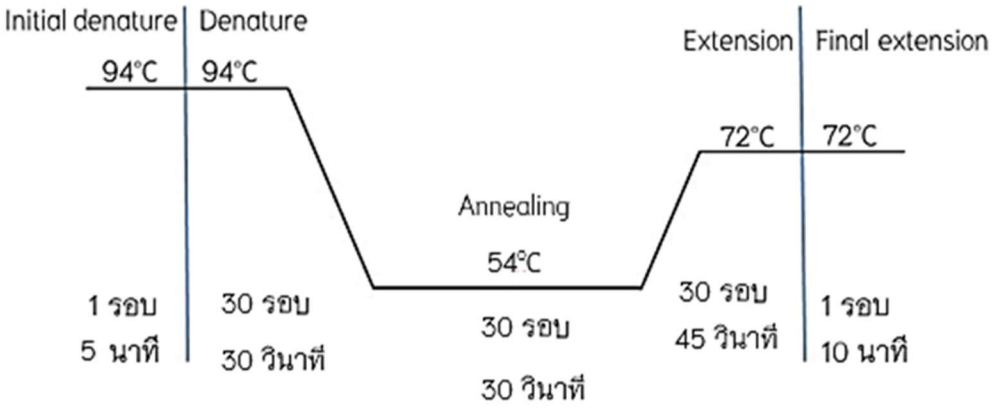
กับไพเมอร์ ITS5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) ตามวิธีการของ White, et al. (1990) โดยมีวิธีการตามลำดับ ดังนี้

6.2.1 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตามลำดับต่อไปนี้มาใส่ลงใน PCR reaction tube ที่วางอยู่บนเกล็ดน้ำแข็งในกล่องพลาสติก

6.2.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 25 µl (total volume) ด้วย deionized distilled water (RNase free water) ปิดฝา แล้วผสมให้เข้ากันดีโดยการใช้ปลายนิ้วสะกิด PCR reaction tube เบา ๆ

6.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 rpm/min เป็นเวลา 2-4 วินาที ก่อนนำไปใส่ลงในเครื่อง Thermo Electron Corporation รุ่น Px2 ตั้งโปรแกรม PCR running condition ดังภาพ 2

1) ddH_2O	18.8 µL
2) Taq Buffer 1X + MgCl 2 mM(Fermentas, USA)	2.5 µL
3) dNTPs 0.2 mM	0.25 µL
4) Forward Primer ITS4 0.25 µM	1 µL
5) Reward primer ITS5 0.25 µM	1 µL
6) DNA Template 10 ng	1 µL
7) Taq DNA Polymerase (Thermo Sciene) 2.5 units	0.13 µL



ภาพ 2 รายละเอียดโปรแกรม PCR running condition

จากนั้นนำลำดับเบสมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง Phylogenetic tree ของเชื้อที่คัดแยกได้ โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ITS4 และ ITS5 เทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI ด้วยโปรแกรม MEGA7

ปฏิกิริยา PCR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS4 และ ITS5 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีการ Agarose Gel Electrophoresis นำมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตบันทึกภาพ นำ PCR product ไปหาลำดับเบส โดยใช้เทคนิค DNA sequencing เพื่อนำไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI เพื่อทำการศึกษาต่อไป

7. การตรวจสอบเชื้อก่อโรคลำไยด้วยเทคนิค Loop mediated amplification (LAMP)

7.1 การออกแบบดีเอ็นเอไพเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรค

นำลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบส จากฐานข้อมูลของ the National Center for Biotechnology Information databases ที่สอดคล้องกับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ โดยออกแบบจาก Specific regions ของดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ การออกแบบจะใช้ชุดของไพเมอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น forward inner primer (FIP), backward inner primer (BIP) โดยไพเมอร์ดังกล่าวออกแบบโดยใช้โปรแกรม เช่น LAMP primer software Primer Explorer V4 ในการออกแบบ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ (Raju Ghosh, et al., 2015)

7.2 สภาวะในการทำเทคนิค LAMP

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค LAMP ทำการเตรียมองค์ประกอบของปฏิกิริยา LAMP PCR ในปริมาตรสุดท้าย 25 µl ดังตาราง 5

นำลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบส จากฐานข้อมูลของ the National Center for Biotechnology Information databases ที่สอดคล้องกับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ โดยออกแบบจาก Specific regions ของดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ การออกแบบจะใช้ชุดของไพเมอร์ชนิดต่าง ๆ เช่น forward inner primer (FIP), backward inner primer (BIP) โดยไพเมอร์ดังกล่าวออกแบบโดยใช้โปรแกรม เช่น LAMP primer software Primer Explorer V4 ในการออกแบบ

ตาราง 5 ส่วนผสมในการตรวจหาดีเอ็นเอด้วยเทคนิค LAMP

Components	25 µl R×N	Final Conc.
10X ThermoPol® Buffer	2.5 µl	1X (contains 2 mM)
$MgSO_4$(100 mM)	1.5 µl	6 mM (8 mM total)
dNTP Mix (10mM)	3.5 µl	1.4 mM each
FIP/BIP Primers (25X)	1 µl	1.6 µM
F3/B3 Primers (25X)	1 µl	0.2 µM

ตาราง 5 (ต่อ)

Components	25 µl R×N	Final Conc.
LoopF/B Primers (25X)	1 µl	0.4 µM
Bst DNA Polymerase (8,000 U/ml)	1 µl	320 U/ml
DNA Sample	Variable	> 10 copies or more
Nuclease–free Water	to 25 µl	
Total Reaction Volume	25 µl	

โดยใช้ลำดับเบสของ Primer ที่ออกแบบจาก Specific regions ของดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ ดังตาราง 6

ตาราง 6 ลำดับเบสของ Primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP PCR

ชื่อ Primer	ลำดับเบส
frF3	ACAACCTCAATGAGTGCG
frB3	CATGAGCGACAACATACCA
frFIP (F1C + F2)	CCAGGCGTACTTGAAGGAACCGTCAAGCAGTCACTAACCAT
frBIP (B1C + B2)	AGCGTGAGCGTGGTATCACACGGTGACATAGTAGCGA
frLoopF	GCTCAGCGGCTTCCTATT
frLoopB	CTCTGGAAGTTCGAGCATCC

จากนั้นนำสารผสมเบื้องต้นให้ความร้อน LAMP amplification ที่อุณหภูมิ 62°C, 63.5°C, 64.5°C และ 65°C เป็นเวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที และให้อุณหภูมิสุดท้ายที่ 85°C เป็นเวลา 10 นาที นำ LAMP product ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (Li, et al., 2013)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลายเพื่อนำมาวิเคราะห์สาเหตุโรค

จากการเก็บตัวอย่างลำไย บริเวณที่มีการระบาดในพื้นที่บ้านต๋ำ จังหวัดพะเยา ที่แสดงอาการของโรคที่ชัดเจน โดยอาการผลลายจะเริ่มจากเป็นจุดสีดำขนาดเล็กขนาด 1–2 มิลลิเมตร บนเปลือกผลของลำไย บางจุดมีขนาดใหญ่เป็นปื้น ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้น จนลุกลามติดกันทั่วทั้งผล เมื่อแกะเปลือกออกมา พบว่า เกิดแผลสีน้ำตาลกับเปลือกด้านใน บริเวณเดียวกันกับแผลที่มีอยู่ด้านนอก ดังภาพ 3

ภาพ 3 ตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลาย

หมายเหตุ: โดยที่

ก คือ ลักษณะอาการของโรคผลลายบริเวณเปลือกด้านนอกของลำไย

ข คือ ลักษณะอาการของโรคผลลายบริเวณเปลือกด้านในของลำไย

ผลลำไยที่ลายมาศึกษาลักษณะของบริเวณที่พบอาการของโรค ภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป พบอาการ คือ มีลักษณะรอยโรคคือมีจุดสีน้ำตาลบริเวณด้านในของเปลือกลำไย ดังภาพ 4

ภาพ 4 ลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนผลลำไยจากพื้นที่ ตำบลบ้านต๊ำ ที่มีการระบาดของโรค ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป

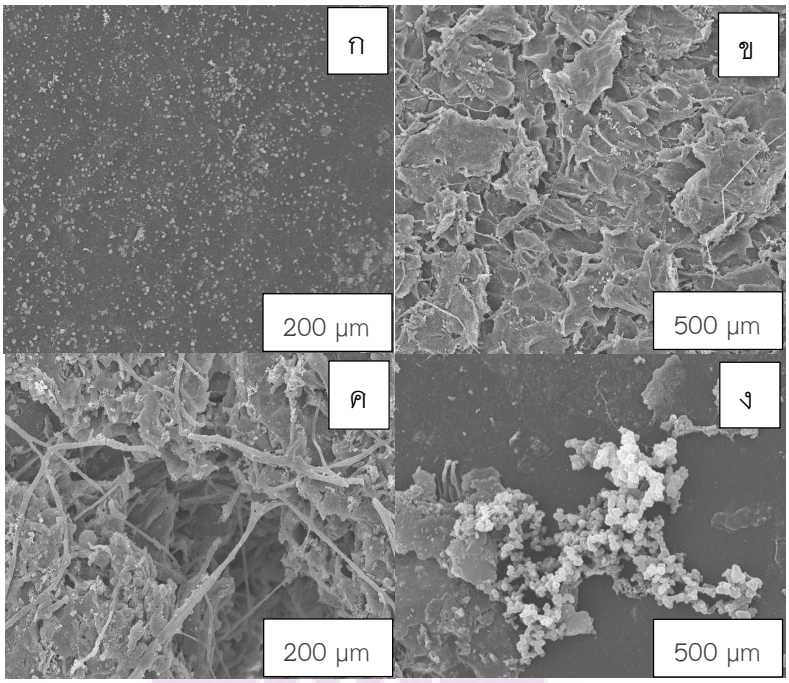
หมายเหตุ: โดยที่

ก คือ ลักษณะอาการของโรคผลลายบริเวณเปลือกด้านนอกของลำไย

ข คือ ลักษณะอาการของโรคผลลายบริเวณเปลือกด้านในของลำไย

การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

การตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) โดยเป็นวิธีการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคอยู่บริเวณเนื้อเยื่อของลำไยที่แสดงอาการของโรค ซึ่งอาจช่วยให้สามารถวินิจฉัยยืนยันสภาพการติดเชื้อ ผลการศึกษา พบว่า ลำไยที่แสดงอาการของโรคผลลาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ดังภาพ 5



ภาพ 5 การศึกษาตัวอย่างศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM)

หมายเหตุ: โดยที่

ก คือ ลักษณะเปลือกด้านนอกที่ไม่เป็นโรคขนาด 200 ไมโครเมตร

ข คือ ลักษณะเปลือกด้านนอกที่แสดงอาการโรคผลลายขนาด 500 ไมโครเมตร

ค คือ ลักษณะเปลือกด้านในที่ไม่เป็นโรคขนาด 200 ไมโครเมตร

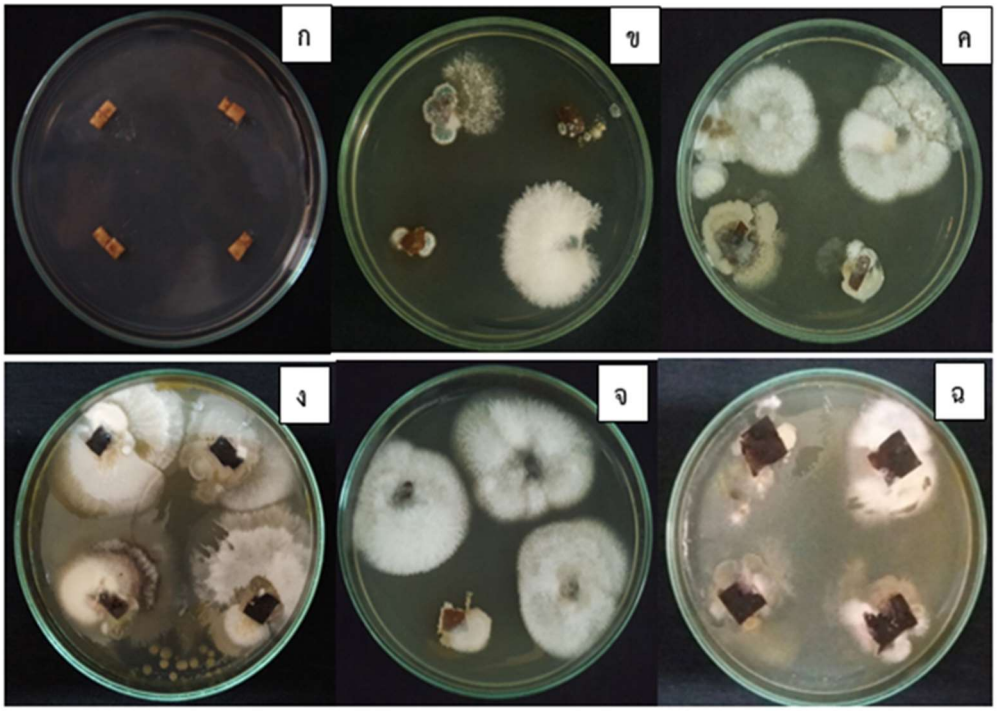
ง คือ ลักษณะเปลือกด้านในที่แสดงอาการโรคผลลายขนาด 500 ไมโครเมตร

ภาพ 5ก จากเปลือกด้านนอกของลำไยที่ไม่แสดงอาการของโรคด้วยกำลังขยายขนาด 200 ไมโครเมตร ภาพ 5ก จะมีลักษณะไม่มีรอยแตกลายบนผิวของลำไย ภาพ 5ข เป็นเปลือกของลำไยด้านนอกที่มีการแสดงลักษณะอาการของโรคผลลาย ด้วยกำลังขยายขนาด 500 ไมโครเมตร จะมีลักษณะเป็นรอยบาดแผลแตกลายบนเปลือกลำไยอย่างเห็นได้ชัดเจน และที่ลักษณะเส้นใย คล้ายเส้นใยเชื้อรา ภาพ 5ค จากเปลือกด้านในของลำไยที่ไม่แสดงอาการของโรค ด้วยกำลังขยายขนาด 200 ไมโครเมตร ไม่พบร่องรอยอาการของโรค ภาพ 5ง เป็นเปลือกของลำไยด้านในที่มีการแสดงลักษณะอาการของโรคผลลาย ด้วยกำลังขยายขนาด 500 ไมโครเมตร จะมีลักษณะมีรอยโรค และจะมีเส้นคล้ายเส้นใยของเชื้อราบริเวณที่ผลลาย

ของเปลือกลำไย รวมทั้งบริเวณเปลือกด้านในของผลลำไย เมื่อเทียบกับเปลือกลำไยที่มีลักษณะปกติ ไม่แสดงอาการของโรคผลลาย

การแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย

จากการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย จากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ด้วยวิธี tissue transplant) โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่ปรากฏโรคกับเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้วางเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 28°C±2°C) เป็นเวลา 1–2 วัน จะเห็นการเจริญของเส้นใยเชื้อราบริเวณชิ้นเนื้อเยื่อลำไยที่มีอาการของโรคผลลาย โดยพบเชื้อราเจริญออกมาจากเปลือกลำไยบริเวณแผลอาการของโรคผลลาย ดังภาพ 6



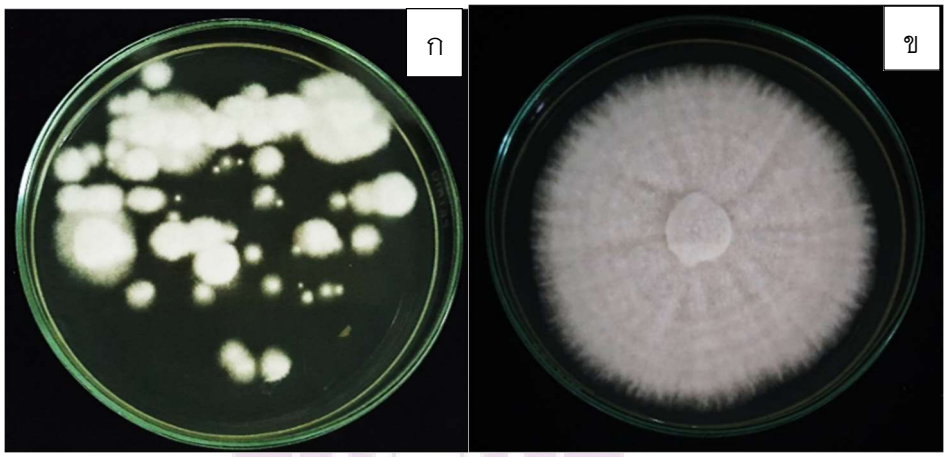
ภาพ 6 การแยกหาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค (tissuetransplant)

หมายเหตุ: โดยที่

ก คือ ชิ้นเนื้อเยื่อของลำไยที่วางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) จานละ 4 ชิ้น

ข–ฉ คือ ลักษณะเชื้อราที่งอกออกมาจากบริเวณบาดแผล เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1–2 วัน

จากนั้นทำการ Sub culture โดยใช้เข็มเขี่ยสะกิดปลายเชื้อรานำมาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) เพื่อให้ได้เชื้อราที่มีความบริสุทธิ์ (Pure culture) โดยจะเลือกเชื้อรามีลักษณะเส้นใยที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของแต่ละไอโซเลท แล้วเก็บไว้บนหลอดอาหารเอียง (slant) เพื่อทำการทดลองต่อไป ดังภาพ 7



ภาพ 7 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) โดยวิธีการ Sub culture

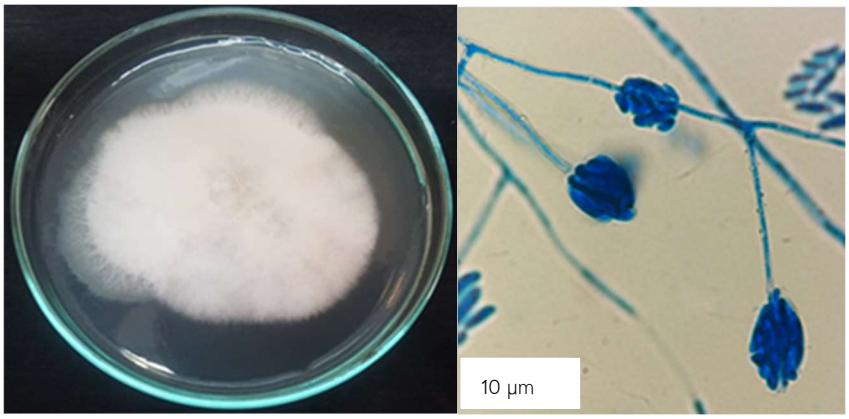
หมายเหตุ: โดยที่

ก คือ การ Restreak เชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar)

ข คือ ลักษณะของเชื้อราที่มีความบริสุทธิ์ (Pure culture)

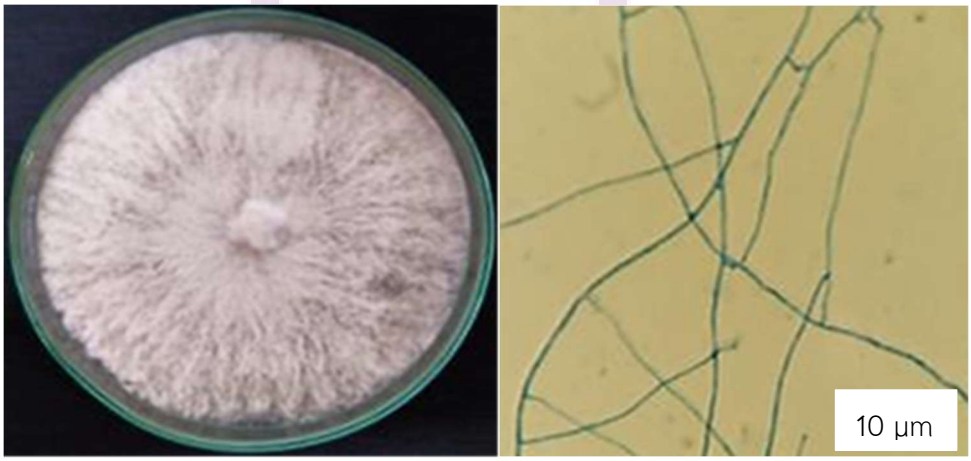
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

เมื่อแยกเชื้อราจากชิ้นลำไยที่ปรากฏโรคผลลายแล้ว คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราที่มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเลือกลักษณะโคโลนี และความแตกต่างของเส้นใยของแต่ละไอโซเลทด้วยสายตา สามารถแยกเชื้อราให้เป็นโคโลนีเดี่ยวได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท นำเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา โดยทำการศึกษาลักษณะของเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลต ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้น นำเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาตรวจสอบลักษณะของเชื้อราด้วยกล้องจุลทรรศน์อีกครั้ง เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ซึ่งผลการศึกษาลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลทภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะดังนี้



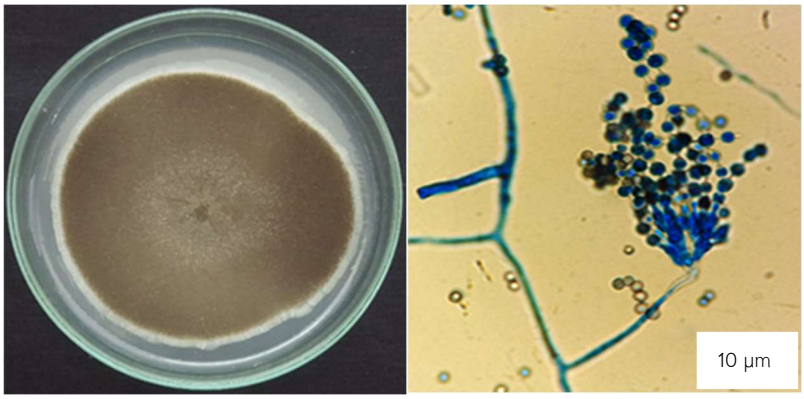
ภาพ 8 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อรา ไอโซเลทที่ 1

หมายเหตุ: เชื้อราไอโซเลตที่ 1 มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีสปอร์เป็นวงรีหรือรูปทรงกระบอกหรือโค้งมีผนังเรียบหรือขรุขระ



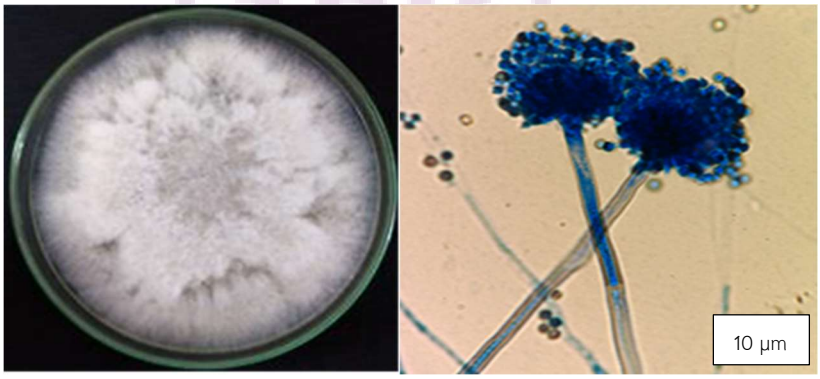
ภาพ 9 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อรา ไอโซเลทที่ 2

หมายเหตุ: เชื้อราไอโซเลตที่ 2 มีลักษณะการสร้างเส้นใยสีขาว เส้นใยแก่จะมีสีเทา เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น



ภาพ 10 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อรา ไอโซเลทที่ 3

หมายเหตุ: เชื้อราไอโซเลตที่ 3 มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาวหรือสีเทาเขียว มีลักษณะค่อนข้างฟู มีสีเขียวเทา รอบนอกสีขาว ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยเป็นแบบไม่ผนังกั้น มีเส้นใยที่แตกแขนง แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชูสปอร์

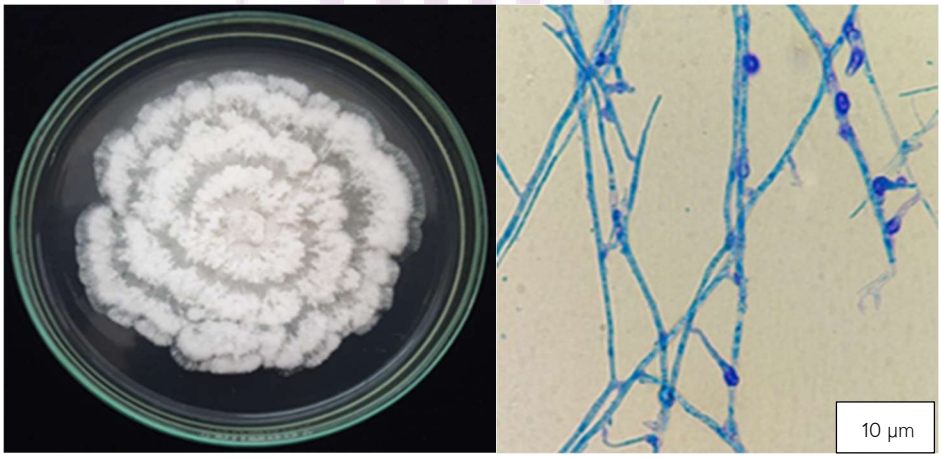


ภาพ 11 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 4

หมายเหตุ: เชื้อราไอโซเลทที่ 4 มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว หนา ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีการสร้างสปอร์ บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) ส่วนปลายของก้านชูสปอร์ โป่งออกเป็นเวสิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (sterigma)

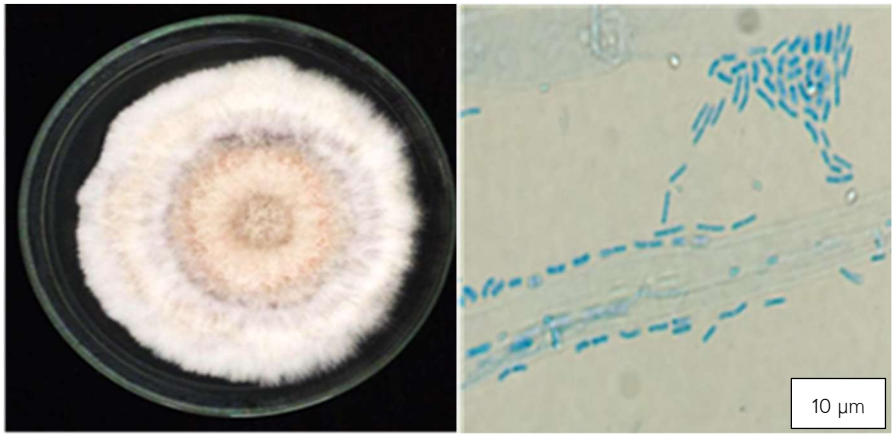
ภาพ 12 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 5

หมายเหตุ: เชื้อราไอโซเลทที่ 5 มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาวและเทา หนา ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยแตกกิ่งก้าน สร้าง sporangia บน sporangiophores โดยให้กำเนิด zoospores ภายใน และสร้าง oospore



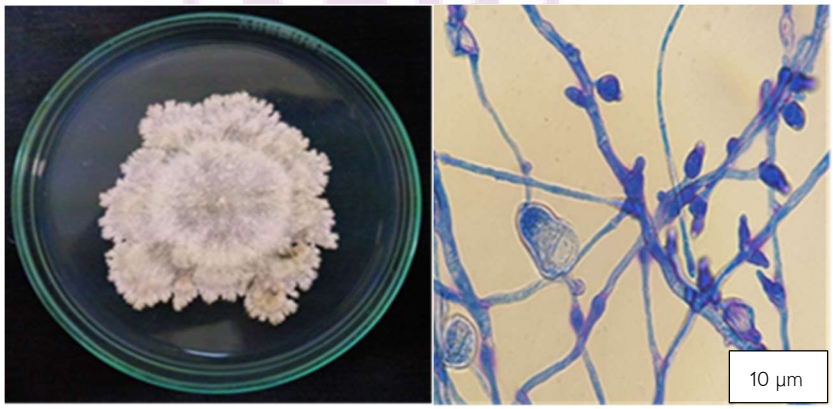
ภาพ 13 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 6

หมายเหตุ: เชื้อราไอโซเลทที่ 6 มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีการสร้างเส้นใยที่มีผนังกั้น



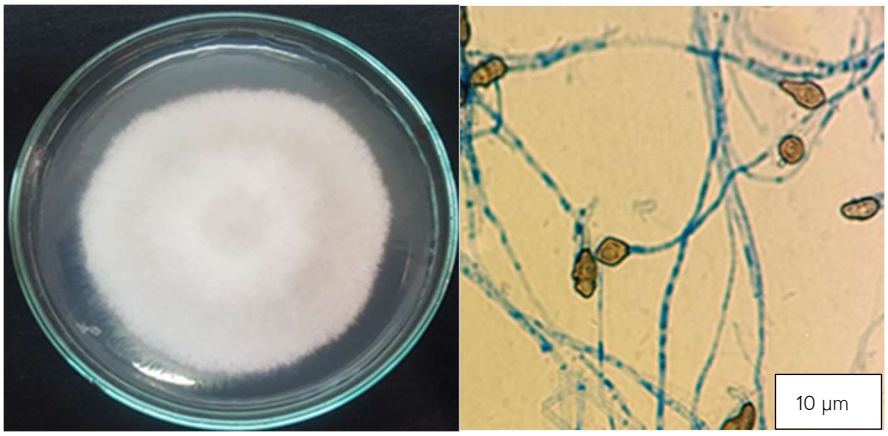
ภาพ 14 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 7

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยสีขาวหรือสีส้ม มีลักษณะค่อนข้างฟู มีสีส้ม รอบนอกสีขาว ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีสปอร์เป็นรูปไข่ ไม่มีสี หรือสีใสและไม่มีผนังกั้น



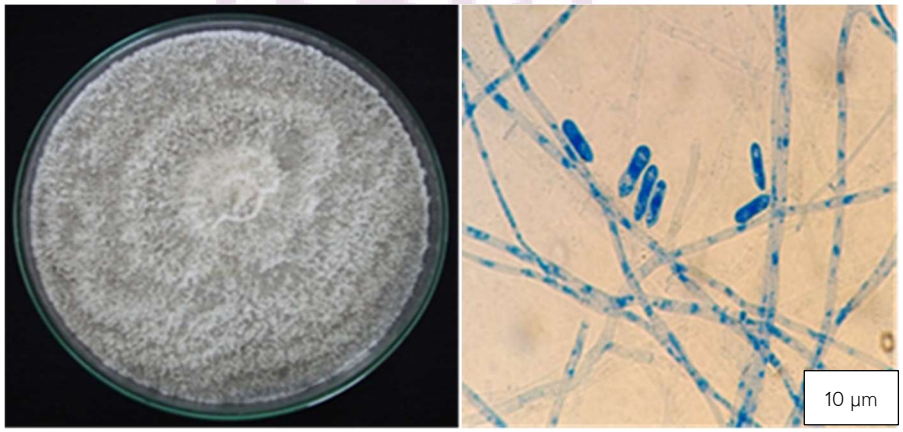
ภาพ 15 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 8

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยสีขาวออกเหลือง ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้นตามขวาง มี sporangiophore ที่เรียวยาว แตกกิ่ง เป็นมุมแหลม ส่วนปลายเรียวยาวและโค้งเล็กน้อย สร้าง sporangium รูปกลม หรือรูปไข่



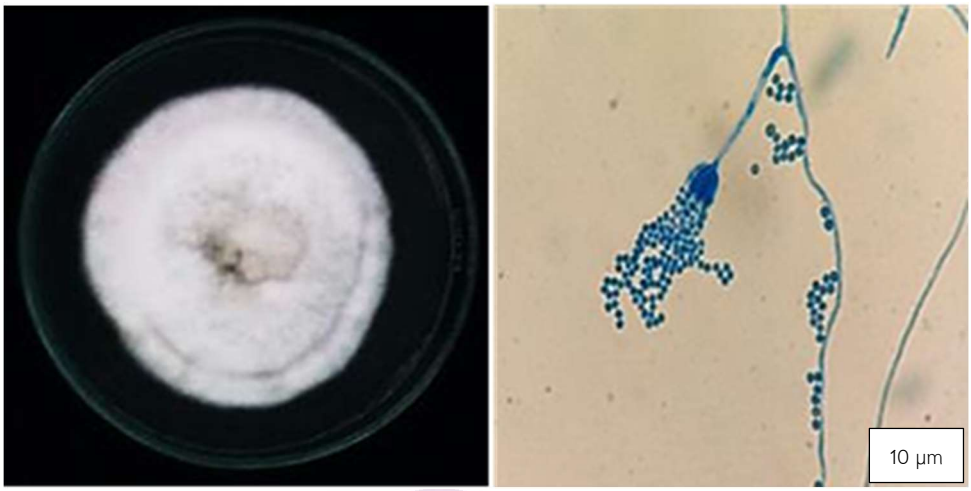
ภาพ 16 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 9

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยแตกกิ่งก้าน สร้าง sporangia บน sporangiophores โดยให้กำเนิด zoospores ภายใน และสร้าง oospore



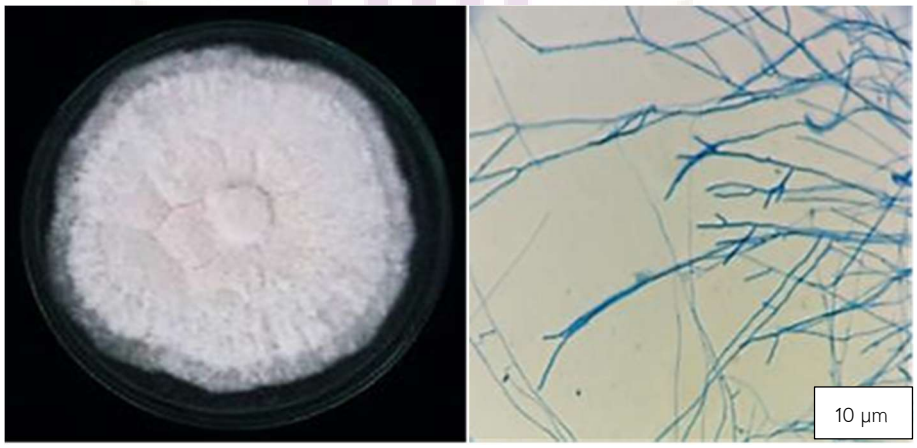
ภาพ 17 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 10

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีขาวเทา ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเชื้อรามีสปอร์เป็นรูปไข่ ไม่มีสี หรือสีใส และไม่มีผนังกั้น



ภาพ 18 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 11

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเป็นแบบไม่ผนังกั้น มีเส้นใยที่แตกแขนง เส้นใยของเชื้อราไม่มีสี แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชูสปอร์

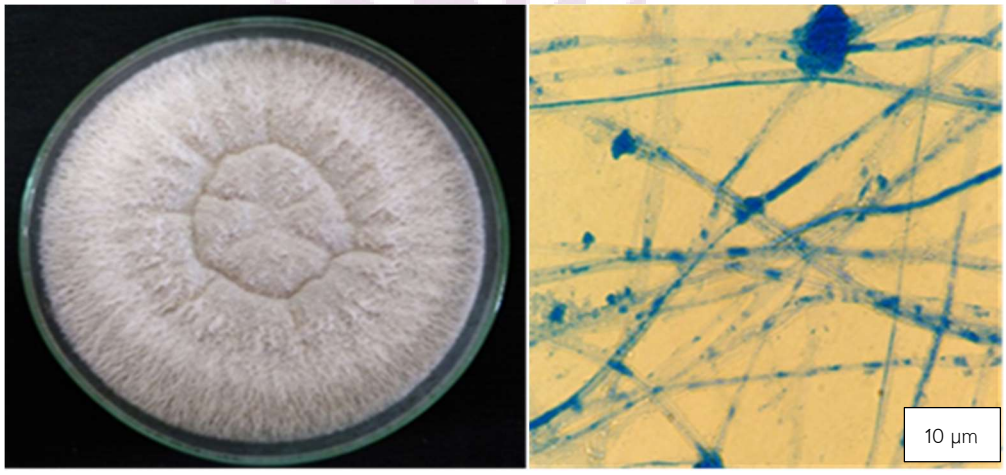


ภาพ 19 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 12

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น

ภาพ 20 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 13

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยที่มีผนังกั้น

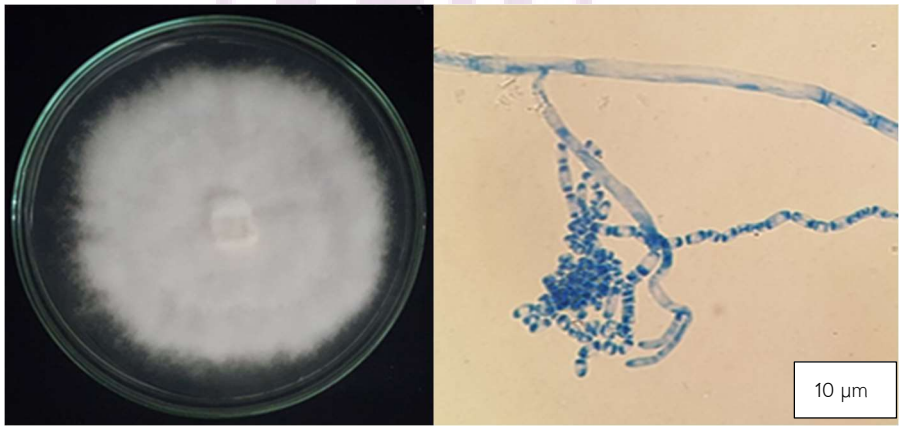


ภาพ 21 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 14

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีดำ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยไม่มีมีผนังกั้น

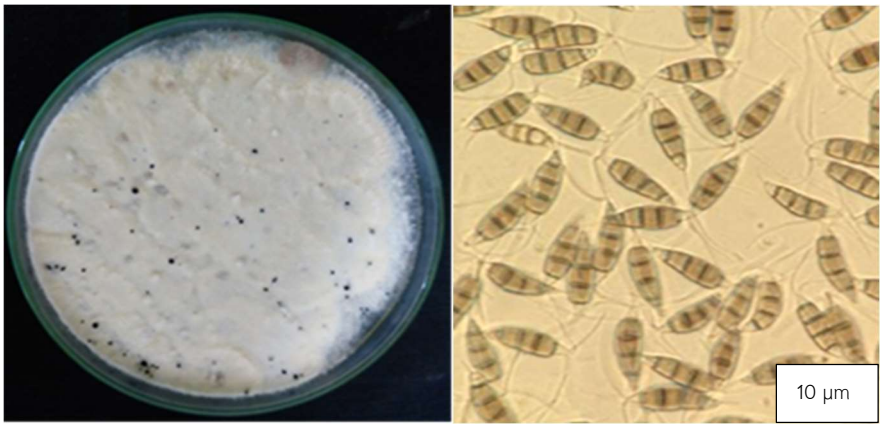
ภาพ 22 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 15

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีสปอร์รูปร่างคล้ายพระจันทร์เสี้ยวหัวท้ายแหลม โดย macroconidia มี 3–4 เซลล์ต่อ 1 สปอร์



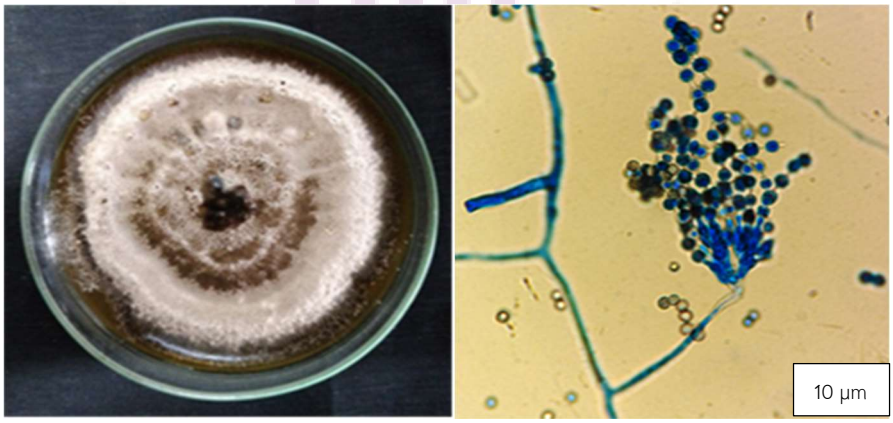
ภาพ 23 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 16

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเชื้อรามีเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น มีเส้นใยที่แตกแขนง แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชูสปอร์



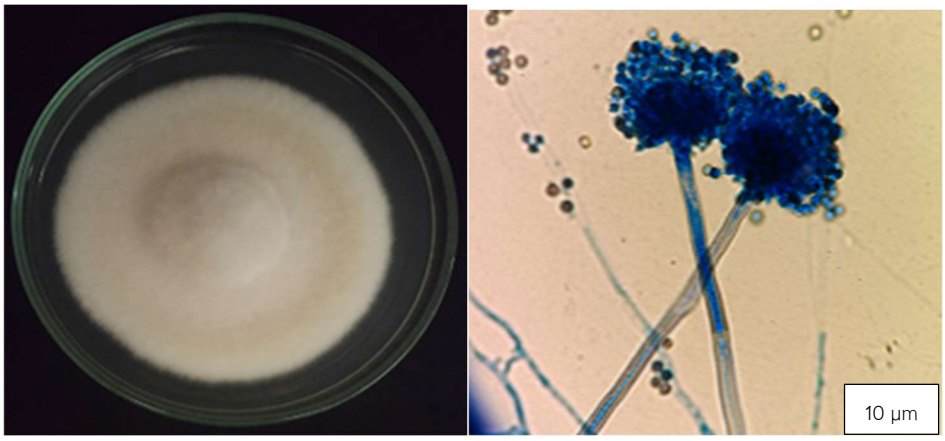
ภาพ 24 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 17

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีขาว เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีดำ ส่วนสปอร์มีรูปร่างทรงรีลักษณะคล้ายมันฝรั่ง ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยที่มีผนังกั้น สปอร์ของเชื้อรามีลักษณะคล้ายมันฝรั่ง ภายในสปอร์มีเส้นกั้นแบ่งเซลล์ หรือที่เรียกว่า septa



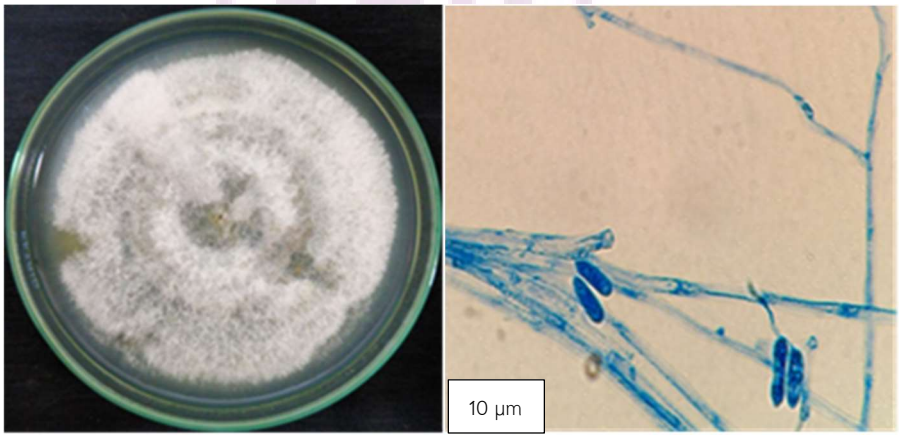
ภาพ 25 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 18

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาวหรือสีน้ำตาล มีลักษณะฟู มีสีขาว รอบนอกสีน้ำตาล ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น มีเส้นใยที่แตกแขนง แต่ละส่วนที่กั้นแล้วมีนิวเคลียสหลายอัน ก้านชูสปอร์



ภาพ 26 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 19

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว ฟู ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีการสร้างสปอร์ บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) ส่วนปลายของก้านชูสปอร์โป่งออกเป็นเวสิเคิล (vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (sterigma)



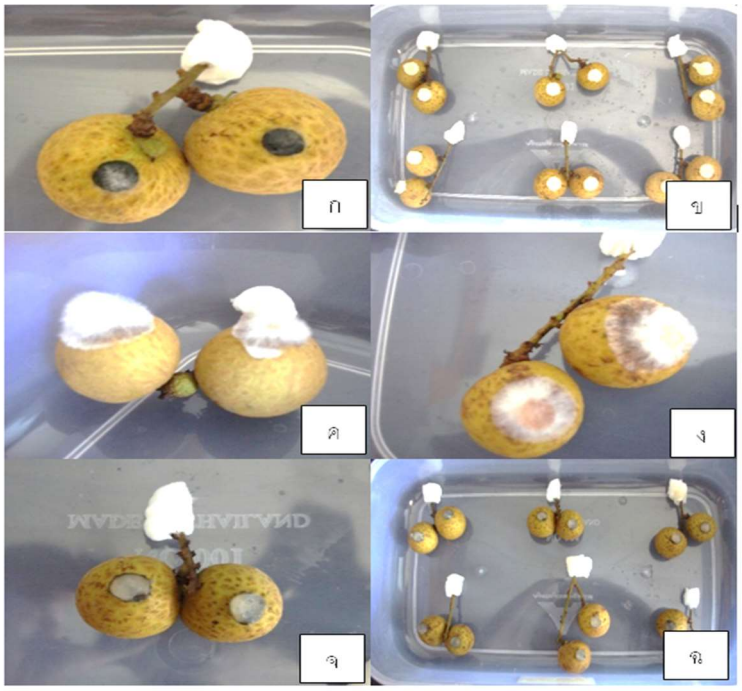
ภาพ 27 การคัดแยกเชื้อราบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) ของเชื้อราไอโซเลทที่ 20

หมายเหตุ: มีลักษณะการสร้างเส้นใยมีสีขาว เมื่อเส้นใยแก่จะมีสีขาวเทา ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40X พบว่า เชื้อรามีเชื้อรามีสปอร์เป็นรูปไข่ ไม่มีสีหรือสีใส และไม่มีผนังกั้น

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

จากการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย จากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ด้วยวิธี tissue transplant) สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต นำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยปลูกเชื้อ (inoculation) บนผลลำไย ในระดับห้องปฏิบัติการและระดับแปลงทดลอง

จากการทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการ ทดสอบคัดเลือกหาเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการผลลายในระดับห้องปฏิบัติการ โดยตัดผลลำไยให้เหลือก้านยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มาล้างฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสำลีที่แช่ด้วยสารละลายเกลือมาตรฐาน (NaCl 0.85%) มาพันบริเวณก้านลำไยที่ถูกตัด จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาทดสอบโดยใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยเชื้อแล้ววางบนผลลำไย ผลละ 1 ชิ้น ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 12 ผล ดังภาพ 28



ภาพ 28 การทดสอบเชื้อราที่คัดแยกได้มาทดสอบบนผลลำไยในระดับห้องปฏิบัติการ

หมายเหตุ: โดยที่

ก–ข คือ ชุดควบคุม

ค–ง ชุดที่ทดสอบด้วยเชื้อแล้วแสดงอาการผลลาย

จ–ฉ ชุดที่ทดสอบด้วยเชื้อแล้วไม่มีอาการผลลาย

เชื้อที่ทดสอบ คือ ไอโซเลต 1 ถึง ไอโซเลต 20 พบว่า เชื้อราไอโซเลต 17 ทำให้เกิดโรคผลลายมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 58.33 % ดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่าเฉลี่ยผลลายในแต่ละไอโซเลต ทั้ง 20 ไอโซเลต ในระดับกล่องทดลอง

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย
ชุดควบคุม	3.33 ± 7.46^{g}
ไอโซเลท 1	20.00 ± 4.56^{f}
ไอโซเลท 2	25.13 ± 8.34^{ef}
ไอโซเลท 3	28.33 ± 4.56^{def}
ไอโซเลท 4	31.67 ± 6.97^{cde}
ไอโซเลท 5	26.67 ± 6.97^{def}
ไอโซเลท 6	33.33 ± 5.89^{cde}
ไอโซเลท 7	36.67 ± 7.46^{bcd}
ไอโซเลท 8	26.67 ± 10.86^{def}
ไอโซเลท 9	25.00 ± 5.89^{ef}
ไอโซเลท 10	20.00 ± 7.45^{f}
ไอโซเลท 11	31.67 ± 6.97^{cde}
ไอโซเลต 12	35.00 ± 6.67^{cde}
ไอโซเลท 13	33.33 ± 5.89^{cde}
ไอโซเลท 14	43.33 ± 10.87^{b}
ไอโซเลท 15	41.67 ± 5.89^{bc}
ไอโซเลท 16	43.33 ± 6.97^{b}
ไอโซเลท 17	58.33 ± 5.89^{a}
ไอโซเลท 18	40.67 ± 6.97^{bc}
ไอโซเลท 19	40.67 ± 6.97^{bc}
ไอโซเลท 20	41.67 ± 8.34^{bc}

หมายเหตุ: อักษร a, b, c, d, e, f, g ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการคัดเลือกหาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผลลายในระดับกล่อง พบว่า เชื้อราไอโซเลท 17 ก่อให้เกิดโรคผลลายมากที่สุด จากนั้นนำเชื้อไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนแปลงปลูก โดยทดสอบเชื้อบนผลลำไย โดยเลือกสุ่มช่อลำไยช่อที่มีจำนวนผลประมาณ 20 ผล/ช่อ ในแต่ละช่อ เชื้อละ 5 ช่อ โดยแยกต้นกัน (1 เชื้อ/1 ช่อ/1 ต้น) พ่นด้วย alcohol 70% ลงบนผลลำไย ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเตรียมเชื้อราโดยขูดสปอร์ที่เจริญบนอาหารให้สัมผัสกับน้ำ แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยที่มีเชื้อราผสมอยู่ให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ spore/ml นำเชื้อราแต่ละไอโซเลทมาฉีดพ่นบนผลลำไย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร/ช่อ เชื้อละ 5 ช่อ โดยแยกต้นกัน เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า ดังภาพ 29 สังเกตลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นบนผลลำไยเมื่อครบ 7 วัน

ภาพ 29 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนต้นลำไย

การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคในสภาพแปลงทดลอง ทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคผลลายบนต้นลำไย พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ทดสอบ คือ เชื้อที่ทดสอบ คือ ไอโซเลท 1 ถึง ไอโซเลต 20 และพบว่า เชื้อราไอโซเลท 17 ทำให้เกิดโรคผลลายมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 65.00% ดังตาราง 8

ภาพ 30 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคผลลาย

หมายเหตุ: โดยที่ ก–ข คือ ชุดควบคุมที่ไม่แสดงอาการโรคผลลาย
ค–ง คือ ลักษณะอาการโรคผลลาย ไอโซเลท 17

ตาราง 8 ค่าเฉลี่ยผลลายในแต่ละไอโซเลต ทั้ง 20 ไอโซเลต ในระดับแปลงทดลอง

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย
ชุดควบคุม	2.00 ± 4.47^{i}
ไอโซเลท 1	42.00 ± 9.08^{cdefg}
ไอโซเลท 2	26.00 ± 4.18^{h}
ไอโซเลท 3	34.00 ± 6.52^{fgh}
ไอโซเลท 4	31.00 ± 5.48^{gh}
ไอโซเลท 5	48.00 ± 8.37^{bcd}
ไอโซเลท 6	45.00 ± 7.07^{bcdef}
ไอโซเลท 7	31.00 ± 10.84^{gh}
ไอโซเลท 8	39.00 ± 9.62^{defg}
ไอโซเลท 9	44.00 ± 7.42^{bcdef}
ไอโซเลท 10	41.00 ± 5.48^{cdefg}

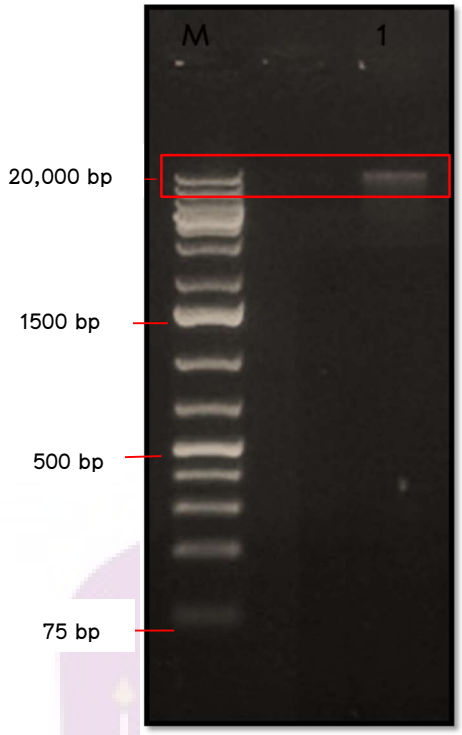
ตาราง 8 (ต่อ)

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ย
ไอโซเลท 11	37.00 ± 7.58 ^{defg}
ไอโซเลท 12	37.00 ± 4.47 ^{bcde}
ไอโซเลท 13	36.00 ± 8.64 ^{efgh}
ไอโซเลท 14	45.00 ± 6.12 ^{bcdef}
ไอโซเลท 15	43.00 ± 11.51 ^{bcdef}
ไอโซเลท 16	54.00 ± 8.22 ^{b}
ไอโซเลท 17	65.00 ± 7.91 ^{a}
ไอโซเลท 18	48.00 ± 8.37 ^{bcd}
ไอโซเลท 19	45.00 ± 7.07 ^{bcdef}
ไอโซเลท 20	52.00 ± 5.70 ^{bc}

หมายเหตุ: อักษร a, b, c, d, e, f, g, h, i ที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

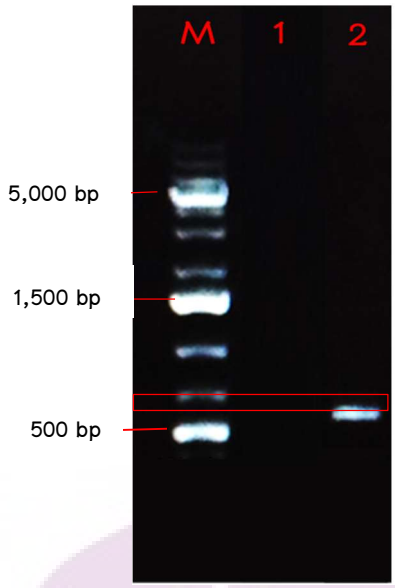
การหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไย

เชื้อราไอโซเลท 17 ซึ่งเป็นเชื้อราก่อให้เกิดโรคผลลายมากที่สุด ในระดับกล่องและในระดับแปลงปลูก มาสกัด genomic DNA เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับการทำ PCR (polymerase chain reaction) ผลจากการหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคในลำไย โดยการระบุสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคในระดับดีเอ็นเอ พบว่า จากการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคผลลายมาระบุสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดมากกว่า 20,000 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus DNA Ladder แล้วนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR ต่อไป ดังภาพ 31



ภาพ 31 genomic DNA ที่สกัดได้จากเชื้อราไอโซเลท Unknown17 ที่คัดเลือกจากลำไยที่เป็นสาเหตุโรคผลลายเปรียบเทียบกับ 1 kb plus DNA ladder (แถวที่ 1)

จากนั้นนำ genomic DNA มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แล้วตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium Bromide บน 1% agarose gel ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลท นำ genomic DNA ไปเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ Primer ITS4 ITS4 ปฏิกิริยา PCR พบว่า ผลผลิตของ PCR ที่ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบที่เข้าไปจับกับไพร์เมอร์ จะมีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดดีเอ็นเอ เท่ากับ 600 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder ดังแสดงในภาพ 32



ภาพ 32 PCR product ของเชื้อราสาเหตุโรคผลลาย โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS4 และ ITS5 เมื่อเทียบกับ 1 kb plus DNA Ladder

หมายเหตุ: โดยที่

M คือ 1 kb plus DNA Ladder

1 คือ น้ำกลั่น–Negative control

2 คือ เชื้อราไอโซเลท 17

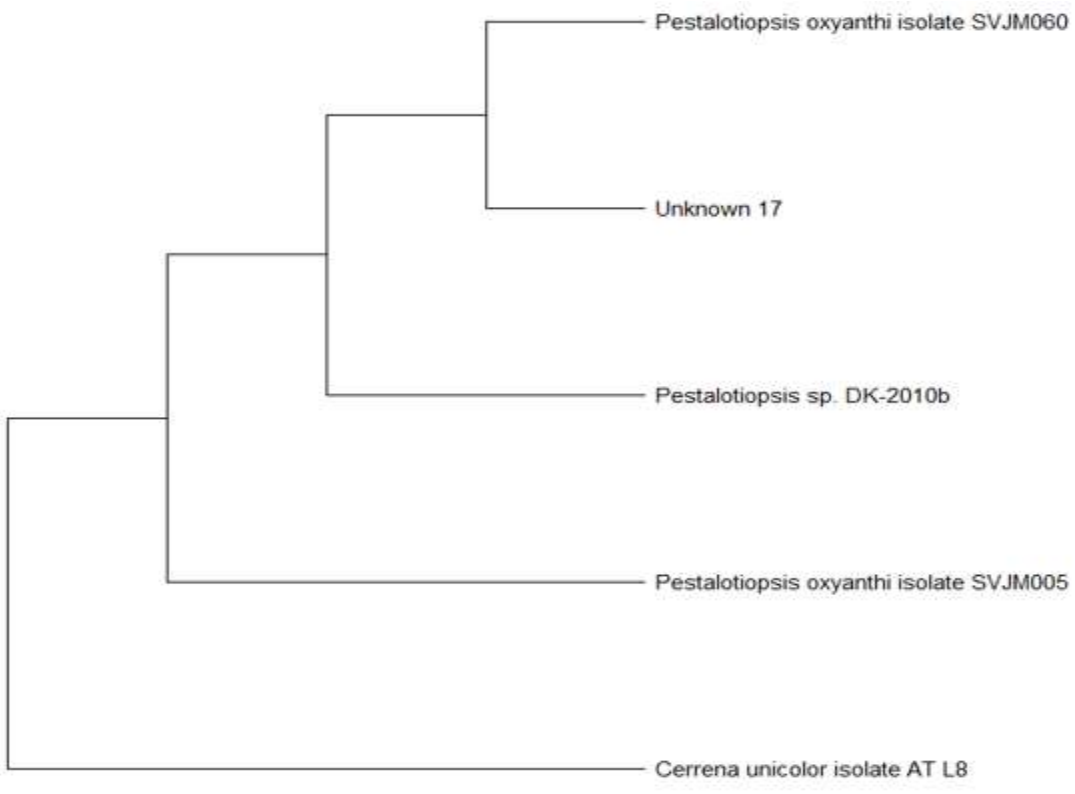
จากทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบโดยวิธีการ gel electrophoresis บน 1% agarose gel นำมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลท บันทึกภาพ นำ PCR product ไปหาลำดับเบส โดยตัด Gel ที่มีลำดับเบสเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer ที่ First BAST Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเซีย พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา ไอโซเลท 17 มีขนาดเท่ากับ 492 bp (ภาพ 33)

TCCTCCTGATCCGAGGTCACCACAAAAAATTGGGGGTTTAGCGGCTGGGAGTTATAGCA
CCTGACAAAAGCGAGAAAAAAATTACTACGCTCAGAGGATACTACAAATCCGCCGITGTATTTCAG
GAACTACAACTATAAAGAAGTAGATTCCCAACACTAAGCTAGGCTTAAGGGTTGAAATGACGCTCG
AACAGGCATGCCCACTAGAATACTAATGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAA
TTCTGCAATTCACATTACITATCGCATITCGCTGCGITCITCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTT
GITGAAAGITTTGACITATTAAAATAAGACGCTCAGATTACATAAAATAACAAGAGITTAATGGTCCAC
CGGCAGCAGCTATAAGAAGACCTATAACTICTGCCGAGGCAACAAAAGGTAAGITCACATGGGTTG
GGAITTAGAAAACTCTATAATGI CCCTCCG

ภาพ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อราไอโซเลท 17

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GeneBank โดยใช้โปรแกรม The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information, 1993) จึงนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา ที่มีการรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank

จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อราไอโซเลท 17 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับเชื้อราที่มีการรายงานบนฐานข้อมูล GenBank ที่มีความคล้ายกันด้วยวิธี Neighbor–Joining โดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 7 ผลการวิเคราะห์ พบว่า ทำการทดสอบความน่าเชื่อถือทางสถิติด้วย Bootstrap test จำนวน 1,000 รอบ ผลการวิเคราะห์ พบว่า เชื้อราไอโซเลท 17 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* isolate SVJM005 โดยมีค่า Identity เท่ากับ 99% (Visalakchi, 2010), *Pestalotiopsis oxyanthi* isolate SVJM060 มีค่า Identity เท่ากับ 99% (Visalakchi, Srinivasan and Muthumary, 2010) และ *Pestalotiopsis* sp. voucher JUF0010 มีค่า Identity เท่ากับ 99% (Sikder, 2018) ดังภาพ 34

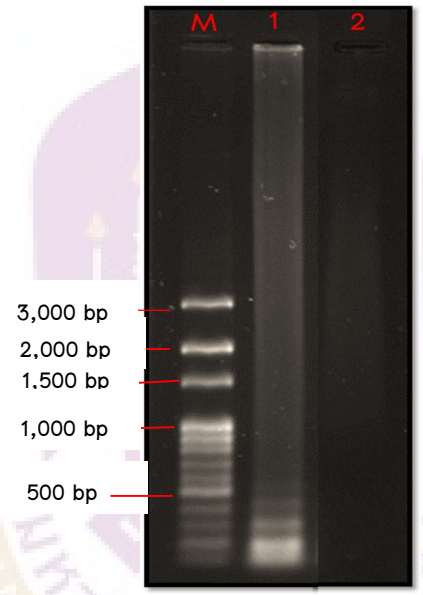


ภาพ 34 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราที่คัดเลือกกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank

การตรวจสอบเชื้อก่อโรคลำไยด้วยเทคนิค Loop mediated amplification (LAMP)

จากการออกแบบดีเอ็นเอไพเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคโดยเทคนิค LAMP การทดลองเริ่มจากการนำลำดับเบสที่ได้จากการหาลำดับเบส จาก ITS nucleotide sequences จากฐานข้อมูลของ the National Center for Biotechnology Information databases ที่สอดคล้องกับชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุ โดยออกแบบจาก Specific regions ของดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ถึงชนิดสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรค การออกแบบจะใช้ชุดของไพเมอรช์นิดต่าง ๆ เช่น forward inner primer (FIP), backward inner primer (BIP) โดยไพเมอร์ดังกล่าวออกแบบ โดยใช้โปรแกรม เช่น LAMP primer software Primer Explorer V4 ในการออกแบบไพเมอร์จะหาได้จากลำดับของนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อราไอโซเลทต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างกัน และมีบริเวณที่จับกับตัวไพเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อราไอโซเลทนั้น ๆ เพื่อจะนำไพเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงไปทำปฏิกิริยา LAMP ต่อไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิค LAMP พบว่า การทดลองในสภาวะที่กำหนดสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ โดยทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขึ้น ทั้งนี้ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่เจาะจงต่อเชื้อก่อโรคต่อไป จากนั้นนำสารผสมองค์ประกอบเบื้องต้นให้ความร้อน LAMP amplification ที่อุณหภูมิ 62°C, 63.5°C, 64.5°C และ 65°C เป็นเวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที และให้อุณหภูมิสุดท้ายที่ 85°C เป็นเวลา 10 นาที นำ LAMP product ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (Li, et al., 2013) พบว่า ตรวจพบผลบวกจากเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* และ *Pestalotiopsis* sp. ตรวจพบผลลบจากหมายเลข 2 ซึ่งเป็นเชื้อ *Cerrena unicolor* ดังภาพ 35



ภาพ 35 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำ LAMP PCR จากการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราโดยการใช้ Primer ในปฏิกิริยา LAMP PCR

หมายเหตุ: โดยที่

M คือ 100 bp DNA ladder

1 คือ *Pestalotiopsis* sp. (ไอโซเลท 17)

2 คือ *Cerrena unicolor*–Negative control

ตาราง 9 ผลบวกและผลลบของดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำ LAMP PCR จากการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราโดยการใช้ Primer ในปฏิกิริยา LAMP PCR

ไอโซเลต	LAMP PCR
Pestalotiopsis sp. (ไอโซเลท 17)	+
Cerrena unicolor	–

หมายเหตุ: โดยที่

M คือ 100 bp DNA ladder

+ คือ *Pestalotiopsis* sp. (ไอโซเลต 17)

– คือ *Cerrena unicolor*–Negative control

จากการตรวจสอบเชื้อก่อโรคในลำไย โดยลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำ LAMP PCR จากการระบุสายพันธุ์ของ เชื้อราโดยการใช้ Primer ในปฏิกิริยา LAMP PCR พบว่าลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ จากเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* และ*Pestalotiopsis* sp. มีผลในเชิงบวก (Positive) เมื่อเทียบกับตัว Negative control คือ *Cerrena unicolor* isolate AT_L8_E12 (Maduranga, 2017) ผลจากการตรวจเชื้อราสาเหตุโรคผลลายในลำไย *Pestalotiopsis oxyanthi* (ไอโซเลท17) โดยใช้ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP PCR frF3 ACAACCTCAATGAGTGCG, frB3 CATGAGCGACAACATACCA, frFIP (F1C + F2) CCAGGCGTAC TTGAAGGAACCGTCAAGCAGT CACTAACCAT, frBIP (B1C + B2) AGCGTGAGCGTGGTATCA CA CGGTGACATAGTAGCGA, frLoopFGCTCAGCGGCTTCCTATT, frLoopB CTCTGGAAGTTCGAG CATCC ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน

พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยให้ขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน โดยผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอ *Pestalotiopsis oxyanthi* และ*Pestalotiopsis* sp. ใช้ primer ในการเพิ่มจำนวนยีน จะให้ PCR product ที่มีขนาดแตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนตำแหน่งยีน และความจำเพาะของไพร์เมอร์แต่ละชนิด

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การเก็บตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคผลลาย เพื่อนำมาวิเคราะห์สาเหตุโรค โดยอาการผลลายจะเริ่มจากเป็นจุดสีดำขนาดเล็ก ขนาด 1–2 มิลลิเมตร บนเปลือกผลของลำไย บางจุดมีขนาดใหญ่เป็นปื้น ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้นจนลุกลามติดกันทั่วทั้งผล เมื่อแกะเปลือกออกมา พบว่า เกิดแผลสีน้ำตาลกับเปลือกด้านในบริเวณตรงข้ามกับแผลที่มีอยู่ด้านนอก จากนั้น ทำการตรวจตัวอย่างที่แสดงอาการด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) โดยเป็นวิธีการศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคอยู่บริเวณเนื้อเยื่อของลำไยที่แสดงอาการของโรค ผลการศึกษา พบว่า ลำไยที่แสดงอาการของโรคผลลาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ลักษณะเปลือกด้านนอกของลำไยที่ไม่แสดงอาการของโรค ด้วยกำลังขยาย ขนาด 200 ไมโครเมตร จะมีลักษณะไม่มีรอยแตกลายบนผิวของลำไย เปลือกของลำไยด้านนอกที่มีการแสดงลักษณะอาการของโรคผลลาย ด้วยกำลังขยาย ขนาด 500 ไมโครเมตร จะมีลักษณะเป็นรอยบาดแผลแตกลายบนเปลือกลำไยอย่างเห็นได้ชัดเจน และที่ลักษณะเส้นใย คล้ายเส้นใยเชื้อรา เปลือกด้านในของลำไยที่ไม่แสดงอาการของโรค ด้วยกำลังขยายขนาด 200 ไมโครเมตร ไม่พบร่องรอยอาการของโรค และเปลือกของลำไยด้านในที่มีการแสดงลักษณะอาการของโรคผลลาย ด้วยกำลังขยายขนาด 500 ไมโครเมตร จะมีลักษณะมีรอยโรค และจะมีเส้นคล้ายเส้นใยของเชื้อราบริเวณที่ผลลายของเปลือกลำไย รวมทั้งบริเวณเปลือกด้านในของผลลำไย เมื่อเทียบกับเปลือกลำไยที่มีลักษณะปกติไม่แสดงอาการของโรคผลลาย และได้นำตัวอย่างลำไยที่มีอาการของโรคมาวิเคราะห์หาสาเหตุของการเกิดโรค ซึ่งพบว่า จากการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย จากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ด้วยวิธี tissue transplant) โดยตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณที่ปรากฏโรคกับเนื้อเยื่อปกติ จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้วางเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 28°C±2°C) เป็นเวลา 1–2 วัน จะเห็นการเจริญของเส้นใยเชื้อราบริเวณชิ้นเนื้อเยื่อลำไยที่มีอาการของโรคผลลาย โดยพบเชื้อราเจริญออกมาจากเปลือกลำไย โดยเชื้อราจะเริ่มงอกออกมาจากบริเวณแผลอาการของโรคผลลาย เมื่อแยกเชื้อราจากชิ้นลำไยที่ปรากฏโรคผลลายแล้ว คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราที่มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยเลือกลักษณะโคโลนี และความแตกต่างของเส้นใยของแต่ละไอโซเลทด้วยสายตา สามารถแยกเชื้อราให้เป็นโคโลนีเดี่ยวได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท นำเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลท มาศึกษา

ลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเทคนิคการเลี้ยงบนสไลด์ (slide cultured technique) ทำการเตรียมทำสไลด์ถาวร หรือกึ่งถาวร ศึกษาการเจริญของเชื้อราที่เลี้ยงบนสไลด์ด้วยตาเปล่าและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายต่ำ จะพบลักษณะของเส้นใย และสปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยยกกระจกปิดสไลด์ขึ้น แล้วหยดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ลงตรงกลางกระจกปิดสไลด์ที่มีเส้นใยเชื้อรา เพื่อให้เอทานอลกระจายเข้าสู่เส้นใยเชื้อรา จากนั้นนำไปวางบนสไลด์เปล่าหยดด้วย Lactophenol cotton blue

จากการแยกเชื้อราสาเหตุของโรคผลลาย จากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค ด้วยวิธี tissue transplant สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท นำไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค โดยปลูกเชื้อ (inoculation) บนผลลำไย ในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับแปลงทดลอง การทดสอบความสามารถการทำให้เกิดโรคในระดับห้องปฏิบัติการ ทดสอบคัดเลือกหาเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการผลลายในระดับห้องปฏิบัติการ โดยตัดผลลำไยให้เหลือก้านยาวประมาณ 3 เซนติเมตร มาล้างฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสำลีที่แช่ด้วยสารละลายเกลือมาตรฐาน (NaCl 0.85%) มาพันบริเวณก้านลำไยที่ถูกตัด จากนั้นนำเชื้อ ที่คัดเลือกได้มาทดสอบโดยใช้ cork borer เจาะปลายเส้นใยเชื้อแล้ววางบนผลลำไย ผลละ 1 ชิ้น ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 12 ผล พบว่า เชื้อราไอโซเลท 17 ทำให้เกิดโรคผลลายมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 58.33 % จากการคัดเลือกหาเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผลลายในระดับกล่อง พบว่า เชื้อราไอโซเลท 17 ก่อให้เกิดโรคผลลายมากที่สุด จากนั้นนำเชื้อไปทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคบนแปลงปลูก โดยทดสอบเชื้อบนผลลำไย โดยเลือกสุ่มช่อลำไยช่อที่มีจำนวนผลประมาณ 20 ผล/ช่อ ในแต่ละช่อ เชื้อละ 5 ช่อ โดยแยกต้นกัน (1 เชื้อ/1 ช่อ/1 ต้น) พ่นด้วย alcohol 70% ลงบนผลลำไย ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเตรียมเชื้อราโดยขูดสปอร์ที่เจริญบนอาหารให้สัมผัสกับน้ำ แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยที่มีเชื้อราผสมอยู่ให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ spore/ml นำเชื้อราแต่ละไอโซเลต มาฉีดพ่นบนผลลำไยปริมาตร 10 มิลลิลิตร/ช่อ เชื้อละ 3 ช่อ โดยแยกต้นกัน เทียบกับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเปล่า พบว่า เชื้อราไอโซเลตไอโซเลท 17 ก็สามารถทำให้เกิดโรคผลลายมากที่สุดเช่นเดียวกับการทดสอบในระดับกล่อง มีค่าเท่ากับ 65.00 % สามารถทำให้เกิดโรคผลลายบนลำไย เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่แสดงอาการของโรคผลลาย

ทำการตรวจโรคโดยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคในลำไย โดยการหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคในลำไย โดยการระบุสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรคในระดับดีเอ็นเอ ที่การสกัดดีเอ็นเอของเชื้อรา ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genejet Genomic Purification Kit นำเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผลลายมาระบุสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ ผลจากการหาลำดับเบสที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคในลำไย โดยการระบุสายพันธุ์เชื้อสาเหตุโรค

ในระดับดีเอ็นเอ พบว่า จากการนำเชื้อราสาเหตุโรคผลลายในลำไยมาระบุสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดของดีเอ็นเอ 20,000 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb Plus DNA Ladder ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR แล้วตรวจสอบโดยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และย้อมด้วย Ethidium Bromide บน 1% agarose gel ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต นำ PCR product ไปหาลำดับเบส โดย ตัด Gel ที่มีลำดับเบสเพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS4 ITS5 และ 5.8S ของเชื้อรา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS4 ITS5 และ 5.8S ของเชื้อราสาเหตุโรคลำไย โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อรา มาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับ universal primer เช่นไพเมอร์ ITS4 ITS4 ปฏิกิริยา PCR พบว่า ผลผลิตของ PCR ที่ได้จากดีเอ็นเอต้นแบบที่เข้าไปจับกับไพร์เมอร์ จะมีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 600 bp เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder

หลังจากได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer ที่ First BAST Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเซีย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา ไอโซเลท 17 มีขนาดเท่ากับ 492 bp ผลการนำ genomic DNA ของเชื้อที่แยกได้ และสามารถก่อโรคกับผลลำไย ได้มาทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า เชื้อราไอโซเลตที่ โดยใช้โปรแกรม The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (National Center for Biotechnology Information, 1993) จึงนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อรา ที่มีการรายงานบนฐานข้อมูล GeneBank พบว่า เชื้อราไอโซเลท 17 มีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* isolate SVJM005 โดยมีค่า Identity เท่ากับ 99% (Visalakchi, Srinivasan and Muthumary, 2010), *Pestalotiopsis oxyanthi* isolate SVJM060 มีค่า Identity เท่ากับ 99% (Visalakchi, Srinivasan and Muthumary, 2010) และ *Pestalotiopsis* sp. voucher JUF0010 มีค่า Identity เท่ากับ 99% (Sikder, 2018)

นำดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ มาตรวจสอบ species โดยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) พบว่า การทดลองในสภาวะที่กำหนดสามารถ ทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ โดยทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอในการตรวจสอบ ซึ่งเกิดได้ทั้งเชื้อทดสอบ และเชื้อเปรียบเทียบ ทั้งนี้ต้องหาสภาวะที่เหมาะสมที่เจาะจงต่อเชื้อก่อโรคต่อไป จากนั้นนำสารผสมองค์ประกอบเบื้องต้นให้ความร้อน LAMP amplification ที่อุณหภูมิ 62°C, 63.5°C, 64.5°C และ 65°C เป็นเวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที และให้อุณหภูมิสุดท้ายที่ 85°C เป็นเวลา 10 นาที นำ LAMP product ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis (Li, et al., 2013) จากการตรวจสอบเชื้อก่อโรคในลำไย โดยลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากการทำ LAMP PCR การระบุสายพันธุ์ของเชื้อรา โดยการใช้ Primer ในปฏิกิริยา LAMP PCR พบว่า ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจาก

เชื้อไอโซเลท *Pestalotiopsis oxyanthi* และ*Pestalotiopsis* sp. มีผลในเชิงบวก (Positive) เมื่อเทียบกับตัว Negative control คือ เชื้อ *Cerrena unicolor* ผลจากการตรวจเชื้อราสาเหตุโรคผลลายในลำไย *Pestalotiopsis oxyanthi และPestalotiopsis sp.* โดยใช้ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา LAMP PCR frF3 ACAACCTCAATGAGTGCG, frB3 CATGAGCGACAACATACCA, frFIP (F1C + F2) CCAGGCGTAC TTGAAGGAACCGTCAAGCAGTCACTAACCAT, frBIP (B1C + B2) AGCGTGAGCGTGGTATCA CA CGGTGACATAGTAGCGA, frLoopFGCTCAGCGGCTTCCTATT, frLoopB CTCTGGAAGTTCGAG CA TCC ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยให้ขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอมีขนาดที่แตกต่างกัน โดยผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ *Pestalotiopsis oxyanthi*, *Pestalotiopsis* sp. การใช้ primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จะให้ PCR product ที่มีขนาดแตกต่างกัน

อภิปรายผลการวิจัย

เชื้อราไอโซเลท 17 ที่แสดงอาการโรคผลลายในการทำการวิจัยนี้ มีความคล้ายกับเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* ซึ่งก่อนหน้านี้ไม่พบรายงานการก่อโรคบนผลลำไย แต่มีรายงานของ Tanja และคณะ ที่พบเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* ว่าเชื้อทำให้เกิดโรคใบไหม้บนต้นเฮเซลนัท (Tanja, *et al.*, 2017) และเชื้อราไอโซเลท 17 ที่คล้ายกับเชื้อ *Pestalotiopsis* sp. ไม่พบรายงานการก่อโรคบนผลลำไย แต่มีรายงานว่าสายพันธุ์ของ *Pestalotiopsis* ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ในพืช ได้แก่ โรคแคงเกอร์, โรคปลายกิ่งแห้ง, โรคใบจุด, โรคใบไหม้, โรคปลายใบแห้ง, โรค grey blight, โรคซีดเหลือง และโรคผลเน่า (Pirone, 1978; Kwee and Chong, 1990; Xu, et al., 1999; Tagne and Mathur, 2001; Sousa, et al., 2004; Espinoza, et al., 2008) เชื้อรา *Pestalotiopsis sp.* เองนั้นก็มีหลาย species ที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าในผลไม้ เช่น Pestalotiopsis versicolor ทำให้เกิดโรคผลเน่าของทับทิม (*Punica granatum L.*) จากการรายงาน พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค เช่น อุณหภูมิ แสง ฯลฯ เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคผลเน่าของฝรั่งหลังการเก็บเกี่ยวนั้น พบว่า มีหลายชนิด คือ *Botryodiplodia theobromae, Aspergillus niger, Colletotrichum sp.*, และ *Pestalotiopsis sp. (Syn. Pestalotia sp.)* ลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับผลหลังจากถูกเชื้อเข้าทำลายจะเกิดแผลจุดสีน้ำตาล หรือสีสนิมบนผล ถ้าอาการของโรครุนแรงขึ้นจะทำให้เปลือกของผลฉีกขาด บางครั้งอาจเกิดการเข้าทำลายถึงส่วนที่เป็นเนื้อของผลไม้ (Utikar, et al., 1980) ซึ่งลักษณะอาการของโรคที่เกิดกับผล หลังจากการเข้าทำลายจนเกิดจุดแผลสีน้ำตาล คล้ายกับอาการที่เกิดบนผลลำไยที่ทำการทดสอบ เชื้อราไอโซเลท 17 มีความคล้ายกับเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* จากการที่ชุด control ของลำไยที่นำมาทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคทั้งในกล่องและในแปลงทดสอบ เนื่องอาจจะเกิดจากการทำความสะอาดที่ผิวของลำไยไม่ดีพอ ทำให้เชื้อที่อยู่

บนผิวของลำไย ที่ติดมากจากสิ่งแวดล้อมภายนอกยังหลงเหลืออยู่ ทำให้เกิดการก่อโรคผลลายบนผลลำไยที่เป็นชุด control ได้

มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับโรคผลแตกผลลายว่า การเกิดโรคดังกล่าวอาจเกิดจากปัจจัยได้ 2 อย่าง คือ อาจเกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคบางชนิด หรือเกิดจากการผิดปกติทางด้านสรีวิทยา เนื่องจากการจัดการสวนไม่ดี หรือทั้งสองอย่างประกอบกัน โดยในปี พ.ศ. 2543 พาวิน มะโนชัย และคณะ (2547) พบโรคผลลายนี้ระบาดหนักในเขต อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ และอำเภอบ้านธิ จังหวัดลำพูน นอกจากนั้น พบว่า เกษตรกรชาวสวนลำไยในอำเภอแม่วาง สันทราย สันป่าตอง และกิ่งอำเภอดอยหล่อ และหลาย ๆ อำเภอ ในจังหวัดเชียงใหม่ และอำเภอแม่ทา จังหวัดลำพูน อำเภอสอยดาว และโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ประสบกับปัญหาของอาการผลลาย ผลแตก และผลร่วงของลำไย โดยอาการดังกล่าวนั้น เกษตรกรยังไม่ทราบสาเหตุของการเกิดโรค และยังไม่สามารถหาวิธีการป้องกัน และแก้ไข ทำให้ผลผลิตลำไยเสียหายอย่างรุนแรง ทำให้เจ้าของสวนลำไยสูญเสียรายได้ และประสบปัญหาการขาดทุนจากการเพาะปลูกลำไย อาการผลลายจะเริ่มจากเป็นจุดสีดำขนาดเล็กบนเปลือกผลของลำไย ต่อมาแผลจะขยายใหญ่ขึ้น จนลุกลามติดกันทั่วทั้งผล เมื่อแกะเปลือกออกมา พบว่า เกิดแผลสีน้ำตาลกับเปลือกด้านในบริเวณตรงข้ามกับแผลด้านนอก แต่เนื้อผลของลำไยมีอาการผิดปกติ เมื่อผลของลำไยเจริญเติบโต และขยายขนาดขึ้น เนื้อเยื่อตรงบริเวณที่เกิดโรคลำไยปริแตก จะส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เข้าทำลาย ทำให้ผลเน่าและร่วงหล่น และเกิดความเสียหายในที่สุด (ชาตรี สิทธิกุล และคณะ, 2547)

ในอดีต จริยา วิสิทธิพานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง (2545) พบโรคผลลาย ผลแตก และผลร่วง แพร่ระบาดอย่างรุนแรงในแหล่งปลูกลำไยที่สำคัญของจังหวัดเชียงใหม่ ที่อำเภอสันทราย หางดง สันป่าตอง จอมทอง และฮอด ในจังหวัดลำพูน พบที่อำเภอเมือง แม่ทา และลี้ และพบโรคนี้ในระดับที่รุนแรงเช่นกัน ในพื้นที่ที่มีการขยายการปลูกลำไยอย่างรวดเร็ว ในภาคตะวันออกของประเทศ คือ ที่จังหวัดจันทบุรี อำเภอโป่งน้ำร้อน บริเวณเพาะปลูกดังกล่าว บางสวนโรคทำความเสียหายมากถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ จริยา วิสิทธิพานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง (2545) รายงานว่าอาการผลลาย มีสาเหตุมาจากเชื้อรา และยังพบเชื้อราอื่นที่มีลักษณะคล้ายกันกับเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคผลลาย แต่ยังไม่สามารถจัดจำแนกชนิดได้ ซึ่งการจัดจำแนกชนิดของเชื้อรานั้นต้องอาศัยลักษณะต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยา (morphology) ได้แก่ ลักษณะรูปร่าง สี การเจริญเติบโตของเส้นใยสปอร์ และโคโลนี เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้ไม่สร้างสปอร์จึงมีความยุ่งยากในการจัดจำแนกและให้ผลที่ไม่แน่นอน ต่อมาในปี 2547 ชาตรี สิทธิกุล และคณะ (2547) ได้รายงานการสำรวจและศึกษาอาการโรคผลลาย ผลแตก และผลร่วงของลำไย อาการผลลาย ผลแตกของลำไย

พันธุ์ดอ พบตามแหล่งปลูกลำไยนอกฤดู ที่สำคัญเกือบทุกแห่งในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และจันทบุรี และในบางพื้นที่อาการรุนแรงเป็นโรค 100% จนไม่สามารถเก็บผลผลิตได้เลย และพบว่า เชื้อทุกไอโซเลต ที่แยกได้นอกจากเข้าทำลายลำไยแล้ว น่าจะเข้าทำลายผลไม้ชนิดอื่น ๆ ด้วย จากการกระตุ้นเชื้อสาเหตุของโรคผลลาย ผลแตก และผลร่วงของลำไย ให้สร้างสปอร์ และการจัดจำแนกชนิด การกระตุ้นให้เชื้อสาเหตุโรคผลลาย ผลแตกของลำไย ให้สร้างสปอร์ ทำทั้งหมด 53 วิธี ผลปรากฏว่า ไม่มีวิธีใดที่สามารถทำให้เชื้อราสร้างสปอร์ได้ และจากการเปรียบเทียบเชื้อราที่เป็นเหตุของโรคผลลาย ผลแตกของลำไยนี้ พบว่า มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Rhizoctonia sp.* แต่การศึกษาดังกล่าวยังไม่ได้ยืนยันผลในการบ่งบอกสายพันธุ์เชื้อสาเหตุทั้งในระดับสปีชีส์ และระดับดีเอ็นเอ เพียงแต่ระบุเป็นกลุ่มเชื้อราเท่านั้น

ปัจจุบันการพัฒนาการตรวจสอบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผลลายอย่างรวดเร็ว อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณ DNA จำเพาะอย่างง่าย โดยใช้อุณหภูมิเดียว หรือที่เรียกว่า เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อหาวิธีตรวจสอบสาเหตุโรคลำไยที่รวดเร็ว โดยอาศัยองค์ความรู้ด้านชีวโมเลกุลเพื่อการวินิจฉัยที่แม่นยำ และป้องกันแก้ไขได้ตรงกับชนิดเชื้อก่อโรค เนื่องจากการตรวจวินิจฉัยโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา ในปัจจุบันยังต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่สามารถสังเกตอาการโรคบนต้นพืช และหากจะระบุเชื้อต้องผ่านวิธีการนำตัวอย่างที่เป็นโรคมาทำการแยกเชื้อและเลี้ยงให้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำมาศึกษาด้านสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ และหากจะทำให้แน่ใจว่าเป็นสาเหตุโรค ต้องนำเชื้อนั้นปลูกเชื้อกลับบนผลลำไยและสังเกตการณ์ก่อโรค ซึ่งต้องใช้เวลานาน มากกว่า 2 สัปดาห์ แต่หากทำทุกขั้นตอนเพื่อการยืนยันผล ต้องใช้เวลาไม่น้อยกว่า 4 สัปดาห์ ซึ่งเป็นเวลานานไม่ทันต่อสถานการณ์ บางครั้งโรคอาจเกิดการระบาดแล้ว แต่ในปัจจุบันมีวิธีทางด้านชีวโมเลกุลที่สามารถระบุเชื้อได้ถึงระดับดีเอ็นเอ ที่มีความแม่นยำ และรวดเร็ว หากพัฒนาเทคนิคดังกล่าวได้จะสามารถตรวจสอบเชื้อได้ในปริมาณน้อยในระดับนาโนกรัม ให้เวลาในการตรวจสอบประมาณ 3 ชั่วโมง ซึ่งสามารถตรวจเชื้อสาเหตุโรคได้ในระยะที่ลำไยยังไม่แสดงอาการโรค จะทำให้สามารถป้องกันกำจัดได้อย่างรวดเร็วและทันเวลา และลดการระบาดของโรคได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคลำไยที่เป็นปัญหาสำคัญของเกษตรกรผู้ผลิตลำไยส่งออกของไทย จากการตรวจสอบชนิดของเชื้อ พบว่า เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผลลายมีความหลากหลายโดยหนึ่งในชนิดที่สำคัญ คือ *Fusarium oxysporum spp*. จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่า *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเหี่ยว Fusarium wilt disease ซึ่งพบได้มากในพืชเศรษฐกิจของทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศอินเดีย ดังนั้นจึงได้พัฒนาการตรวจสอบเชื้อ *Fusarium oxysporum f.* sp. ciceris โดยใช้เทคนิค LAMP พบว่า เชื้อที่มีความสามารถก่อให้เกิดโรคผลลายที่เด่นชัดเช่น คือ เชื้อรา ไอโซเลท 17 มีความคล้ายกับเชื้อ *Pestalotiopsis oxyanthi* และ *Pestalotiopsis* sp เมื่อเทียบกับ

ผลบนการทดลอง ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า เชื้อหลักที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อการเกิดโรคผลลายอย่างสูง ผลดังกล่าวชี้นำการนำวิธีดังกล่าวไปใช้ตรวจสอบเชื้อดังกล่าวในสภาพแวดล้อมจริง หรือสวนลำไยโดยตรง เพื่อหาข้อมูลการกระจายของเชื้อดังกล่าว และการทำนายความเสี่ยงของสวนลำไยต่อการเกิดโรคผลลาย

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคลำไย ในระยะที่เกิดโรคพืชยังไม่แสดงอาการของโรค (เชื้อสาเหตุมีปริมาณน้อย) โดยนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ทดสอบความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อสาเหตุโรคลำไย ซึ่งสามารถที่จะตรวจหาเชื้อก่อโรคในลำไยได้ ในขณะที่ผลของลำไยลูกเล็ก และยังสามารถตรวจสอบได้ในช่วงที่ผลยังไม่แสดงอาการของโรค เนื่องจากการทดสอบในขั้นตอน LAMP ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียง 10 ng ในการตรวจสอบ และสามารถตรวจหาเชื้อก่อโรคที่ยังไม่มีการแพร่กระจายได้ เพื่อย่นระยะเวลาในการตรวจสอบโรค และทำให้การป้องกันกำจัดอย่างรวดเร็ว ตรงจุด และการป้องการแพร่ระบาดได้ทันเวลา

2. ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

เนื่องจากบนผิวของลำไยอาจจะมีเชื้อโรคที่อยู่ตามสิ่งแวดล้อมภายนอกติดอยู่ ทำให้ผลการทดสอบเชื้อในระดับแปลงปลูกอาจจะมีความคลาดเคลื่อนจากเชื้ออื่น จึงควรหาวิธีป้องกัน โดยเลือกพื้นที่ทดสอบที่ไม่มีประวัติการเกิดโรคผลลายและโรคอื่น ๆ รวมถึงศัตรูพืชที่อาจเป็นพาหะนำโรค อีกทั้งยังต้องทำความสะอาดผิวของลำไยก่อนการทดสอบ เพื่อป้องกันผลกระทบจากเชื้ออื่น ๆ การกำจัดโรคผลลายที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมกับพื้นที่จังหวัดพะเยา

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กองส่งเสริมการอารักขาพืชและจัดการดินปุ๋ย. (2560). **คู่มือการสำรวจแปลงติดตามสถานการณ์ศัตรูพืช และการใช้งาน**. กรุงเทพฯ: กลุ่มพยากรณ์และเตือนการระบาดศัตรูพืช กรมส่งเสริมการเกษตร.

เกศิณี ระมิงค์วงศ์. (2546). **การจำแนกไม้ผล**. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. (2561). **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับโรคพืช**. สืบค้นเมื่อ 25 เมษายน 2561, จากhttp://ento-ppat.agri.cmu.ac.th/ppath_intro.html.

ชาตรี สิทธิกุล, อังสนา อัครพิศาล, พงค์ยุทธ นวลบุญเรือง และอรุณ โสตถิกุล. (2547). **การจัดการโรคและแมลงศัตรูที่สำคัญของลำไยนอกฤดูในเขตภาคเหนือ.**

จริยา วิสิทธิพานิช, ชาตรี สิทธิกุล และเยาวลักษณ์ จันทร์บาง. (2545). **โรคและแมลงศัตรูลำไย ลิ้นจี่ และมะม่วง.** เชียงใหม่: ธนบรรณ.

จิตรลดดา แซ่เตียว, เต็มดวง ลิ้มไพบูลย์, พัชรี เจียรนัยกูร และจุรีรัตน์ ดาดวง. (2011). **การพัฒนาชุดตรวจกรองหาเชื้อ Human papillomavirus type 58 ในผู้ป่วยไทยที่เป็นมะเร็งปากมดลูก ด้วยเทคนิค Loop-Mediated isothermal amplification.** ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ดาวเรือง ศรีกอก. (2530). **ดัชนีการเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษาผลลำไยพันธุ์ดอ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ธงชัย แก้วพินิจ, สมชาย สันติวัฒนกุล และโกสุม จันทร์ศิริเทคนิค. (2013). **Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) สำหรับตรวจเชื้อวัณโรค.** กรุงเทพฯ: สำนักนวัตรรมการเรียนรู้ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

นิพัฒน์ สุขวิบูลย์. (2552). **เอกสารวิชาการพันธุ์ลำไย** (พิมพ์ครั้งที่ 2). เชียงราย: อินเตอร์พริ้นท์.

นิรุต เทียมเพชร และวิพรพรรณ์ เนื่องเม็ก. (2556). การคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟท์ที่สามารถควบคุมโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ของต้นกล้ายูคาลิปตัส. **วารสารแก่นเกษตร**, 41(1), 505-512.

พงษ์ศักดิ์ อังกสิทธิ์, ดุษฎี ณ ลำปาง และรำไพวรรณ อภิชาตพงศ์ชัย. (2542).**ลำไย: ไม้ผลเศรษฐกิจสำคัญเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรม.** เชียงใหม่: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พาวิน มะโนชัย, ยุทธนา เขาสุเมรุ, ชิติ ศรีตนทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. (2547). **เทคโนโลยีการผลิตลำไย**. กรุงเทพฯ: ฟิสิกส์เซ็นเตอร์.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. (2540). **เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).** กรุงเทพฯ: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภัทรา พลับเจริญสุข และปัณรสี สู่ศิริรัตน์, (2556). **การพัฒนาการประเมินความเฉพาะเจาะจงและประสิทธิภาพความไวของเทคนิค Loop Mediated Isothermal amplification (LAMP) เพื่อตรวจวิเคราะห์เชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์สร้าง Aflatoxin ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรขมิ้นชันและขิง**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาลัยธุรกิจบัณฑิตย์, กรุงเทพฯ.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา. (2555). **การนับปริมาณเชื้อตัวอย่างด้วย Haemacytometer**. สืบค้นเมื่อ 19 มกราคม 2561, จาก http://fe.rmutl.ac.th/wp-content/uploads/Lab-การหมักและการควบคุมถังหมัก.

มิตรชัย ทาบุดดา. (2546). **การสำรวจพันธุ์ลำไยในเขตภาคเหนือตอนบนและการสร้างฐานข้อมูลของลำไย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ, สาลี่ ชินสถิตย์, พัฒน์พงศ์ ภัทรโกศล, และชูชาติ วัฒนวรรณ. (2545). การศึกษาสาเหตุเบื้องต้นของโรคลำไยเปลือกผลแตกและเน่า. **วารสารโรคพืช,** 16(1-2), 71-73.

รุ่งทิพย์ จั่นเพ็ชร, วิชัย โฆสิตรัตน, Scott, A. และสุจินต์ ภัทรภูวดล. (2560).การตรวจเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ในพืชวงศ์แตง ด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**, 48(2), 221-230.

วันวิสาข์ ริมประณาม และสมศิริ แสงโชติ. (2545). การสำรวจเบื้องต้นเกี่ยวกับโรคของผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยวในเขตโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 33(6 พิเศษ), 131-133.

วัลลา ดิฐพงษ์พิชญ์, เพชรรัตน์ ศิริวงศ์, ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี, จุฑาเทพ วัชรไชยคุปต์ และประสาน สืบสุข. (2541). **การพัฒนาและการใช้เทคนิคดีเอ็นเอสำหรับตรวจหาแบคทีเรียสำคัญของมะเขือเทศและพริก**. กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. (2551). **ราวิทยาเบื้องต้น** (พิมพ์ครั้งที่ 2). นครปฐม: ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริพร โปธา, ชาตรี สิทธิกุล, จริยา วิสิทธิ์พานิช, พงศ์ยุทธ นวลบุญเรือง และสมบัติ ศรีชูวงศ์. (2546). **สาเหตุของโรคผลลายของลำไย และการป้องกันกำจัด.** วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ศูนย์วิจัยเศรษฐกิจและพยากรณ์ทางการเกษตร คณะเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้. (2553). **ผลการสำรวจความคิดเห็น เรื่อง "เสียงสะท้อนชาวสวน ก่อนผลผลิตลำไยออกสู่ตลาด**". เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2562). **ตารางแสดงรายละเอียดลำไย.** สืบค้นเมื่อ 13 มีนาคม 2561, จาก http://www.oae.go.th/view.

สารานุกรม. (2559). **โรคของลำไย**. สืบค้นเมื่อ 1 มกราคม 2562, จาก http://202.28.248.62/ontology/App_View/Wiki/ Content.aspx?nodeID=758.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2557). **ข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร**. สืบค้นเมื่อ 23 มิถุนายน 2561, จาก http:// www.oae.go.th/download prcalfarmcrop/longan. pdf.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2559). **ศูนย์ข้อมูลผลไม้** สืบค้นเมื่อ 23 มิถุนายน 2561, จาก http://www.oae.go.th/fruits/index.php.

อรัญญา ตันติปัญจพร. (2534). **การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลก็ตรอน แบบสแกน.** กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกพันธ์ บางยี่ขัน. (2547). **วิทยาเห็ดรา.** นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร.

Agrawal, O. P., Shashi, D., Garg, K. L., Fauzia, S., Nimisha, P. and Anupama, M. (1988). Study of biodeterioration of the Ajanta wall paintings. **International Biodeterioration** 24, 2, 121–129.

Botha, W. J., Serfontein, S., Greyling, M. M. and Berger, D. K. (2001). Detction of *Xylophilus ampelinus* in grapevine cutting using a nested polymerase chain reaction. **Plant Pathology,** 50, 515–526.

Brock, T.D. and Brock, K. M. (1978). **Microbiology with Application.** New Jersey: Prentice–Hall.

Dai, T., Lu, C., Lu, J., Dong, S., Ye, W., Wang, Y., et al. (2012). Development of a loop mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae*. **FEMS Microbiology Letters,** 334(1), 27–34.

Espinoza, J., Romero, R., Kusanovic, J. P. Gotsch, F., Lee, W., Goncalves, L. F., et al. (2008). Stansarsised views of the fetal heart using four–di–mensional sonographic and tomographic imaging. **Ultrasound in Obstetrics and Gynecology,** 31, 233–242.

Fisher Scientific. (n.d.). **Generuler 1 kb plus DNA Ladder (invitrogen™)**. Retrieved June 6, 2018, from https://www.fishersci.com/us/en/home.html.

Gavidia, I., Castillo, A. L. and Perez–Bermudez, P. (1996). Selection and long–term cultures of high–yielding Digitalis obscura plants: **RAPD markers for analysis of genetic stability**, 121, 197–205.

iGEM Concordia. (2014). **Haemacytometer**. Retrieved March 18, 2018, from http://igem.org/wiki/index.php?title=Team:Concordia/Notebook&oldid=383709.

Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985). Individual specific fingerprints of human DNA. **Nature,** 316, 76–79.

Kwee, L. T. and Chong, K. K. (1990). **Guava in Malaysia: Production, Pests and Diseases.** Kuala Lumpur: Tropical Press.

Li, B., Du, J., Lan, C., Liu P, Weng, Q. and Chen, Q. (2013). Development of a loop–mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* race 4. **Eur J Plant Pathol,** 137, 597–607.

Maduranga, K., Santhrisegaram, S., Attanayake, R. N., Weerakoon, G. and Paranagama, P. A. (2017). **Diversity and bioactivity of endolichenic fungi in mangrove ecosystems**, Puttalam Lagoon, Sri Lanka Diversity and bioactivity of endolichenic fungi in mangrove ecosystems, Puttalam Lagoon, Sri Lanka.

Martin, F., Abad, Z., Balci, Y. and Ivors, K. (2012). Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. **Plant Dis,** 96, 1080–1103.

Nakao, R., Stromdahl, E., Magona, J., Faburay B, Namangala, B. M., Inoue, N, et al. (2010). Development of loop–mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection of *Ehrlichia ruminantium*. **BMC Microbiol,** 10, 296.

National Center for Biotechnology Information. (1993). **Annual report: National Center for Biotechnology Information Volume 1993.** South Carolina: Nabu Press.

Niessen, L. and Vogel, R. F. (2010). Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loopmediated isothermal amplification (LAMP) assay. **Int J Food Microbiol,** 140, 183–91.

Niu, J., Jian, H., Guo, Q., Chen, C., Wang, X., Liu Q, et al. (2012). Evaluation of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNAIGS2 regions. **Plant Pathology,** 61(4), 809–819.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., et al. (2000). Loop–mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res,** 28, 63.

Pan, Y., Richard, A. B., Jingyun, F., Richard, H., Pekka, E. K. and Werner, A. (2011). A Large and Persistent Carbon Sink in the World's Forests. **Science,** 333(6045), 988–993.

Parida, M., Posadas, G., Inoue, S., Hasebe, F. and Morita, K. (2004). Realtime reverse transcription loop–mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. **J Clin Microbiol,** 42, 257–63.

Paulo, J., Camargo, D. S., Daiani, C. S., Renata, R. G. and Pirone, P. P. (1978). **Diseases and pests of ornamental plants**. New York: Wiley Interscience.

Pirone, P. P. (1978). Mealybugs. In **Diseases and Pests of Ornamental Plants** (5th ed.). New York: Wiley.

Pratt, P. E. (1965). Potassium. In Black. C. A. (ed.). **Methods of Soil Analysis: Part 2– Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monograph 9.** Madison: American Society of Agronomy Inc.

Raju, G., Avuthu, N., Anindita, S. and Mamta, S. (2015). Development of Loop–Mediated Isothermal Amplification (LAMP) assay for rapid detection of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris–wilt pathogen of chickpea. **BMC Research Notes,** 8, 40.

Riker, A. J. and Riker, R. S. (1936). **Introduction to Research on Plant Disease**. St. Louis: John S. Swift.

Seal, S. E. and Elphinstine, J. G. (1994). Advances in identification and detection of *Pseudomonas solanacearum*. In Hayward A. C., and Hartman G. L. (ed.): bacterial wilt; **The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum***. Walingford: CAB international.

Sikder, H. (2018). Probability assessment of burst limit state due to internal corrosion. **International Journal of Pressure Vessels and Piping,** 89, 48–58.

Souza, A. L. de., Garcia, R., Bernardino, F. S., Rocha, F. C., Valadares Filho, S. de C., Pereira, O. G., et al. (2004). Coffee hulls in the diet of sheep: intake and apparent digestibility. Rev. **Bras. Zootec.,** 33, 2170–2176.

Tagne, A. and Mathur, S. B. (2001). First report of chlorotic spot of maize caused by *Pestalotiopsis neglecta*. **Plant Pathol,** 50, 791.

Tanja, V., Darko, J., Vesna, K., Aleksandar, L., Andjelkovic, S., Sanja, Z., et al. (2017). Morphological description and molecular detection of *Pestalotiopsis* sp. on hazelnut in Serbia. **Spanish Journal of Agricultural Research,** 15(3), 1–5.

Thekisoe, O. M., Bazie, R. S., Coronel–Servian, A. M., Sugimoto, C., Kawazu, S. and Inoue, N. (2009). Stability of loop–mediated isothermal amplification (LAMP) reagents and its amplification efficiency on crude trypanosome DNA templates. **J Vet Med Sci,** 71, 471–475.

Tomlinson, J., Dickinson, M. and Boonham, N. (2010). Rapid detection of *Phytophthora ramorum* and *P.kernoviae* by two–minute DNA extraction followed by isothermal amplification and amplicon detection by generic lateral flow device. **Phytopathology**, 100, 143–149.

Utikar, P. G., Sherkar, B. V., More, B. B. and Shinder, P.A. (1980). Pestalotipsis vesicolor a new fruit spot pathogen on pomegranate forme India. **India Phytopathology**, 33(2), 343–344.

Visalakchi, S., Srinivasan, K. and Muthumary, J. (2010). **Screening of taxol producing endophytic fungus from medicinal plant**. Madras: University of Madras.

Xu, P. X., Zhang, X., Heaney, S., Yoon, A., Michelson, A. M., Maas, R. L. (1999). Regulation of pax6 expression is conserved between mice and flies. **Development,** 126(2), 383––395.

Yonermoto, Y., Chowdhury, A. K., Kato, H. and Macha, N. M. M. (2006). Cultivars identification and their genetic relationships in *Dinnocarpus longan* subspecies based on RAPD markers. **Scientia Horticulture,** 109, 147–152.

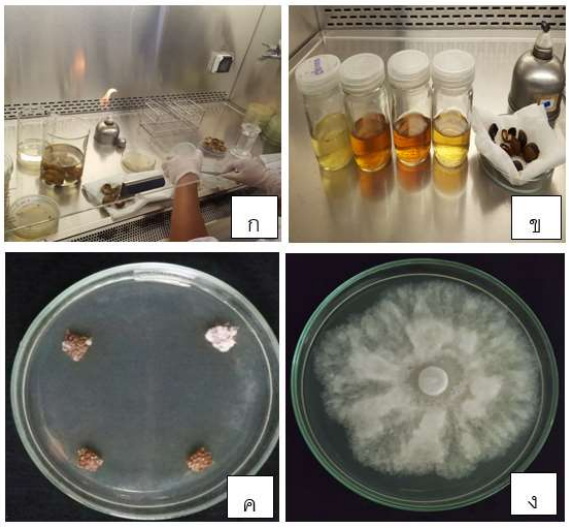
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก เทคนิคการแยกเชื้อ

การแยกเชื้อสาเหตุของโรค

ในการวินิจฉัยสาเหตุเบื้องต้นของการเป็นโรคของพืชนั้น ต้องทราบให้ได้ว่า เกิดจากปัจจัยของเชื้อสาเหตุ หรือปัจจัยทางกายภาพ ในบางกรณี อาการของโรคที่แสดงจะเป็นตัวบ่งบอกถึงสาเหตุของโรคได้ ในทางกลับกัน โรคบางชนิดอาจไม่สามารถตอบได้ถึงเชื้อสาเหตุในทันที ในกรณีของโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุ เช่น เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย ส่วนใหญ่จะพบว่ามีเชื้อสาเหตุนั้นอยู่ในบริเวณผิวพืชที่เป็นโรค หรืออาศัยอยู่ภายในส่วนต่าง ๆ ของพืชที่เป็นโรคหรือแม้กระทั่งในดินที่ปลูกพืชนั้น ๆ ในปัจจุบันแม้จะมีวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามามีบทบาท ในการตรวจวิเคราะห์ทางโรคพืชอย่างกว้างขวาง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในหลายส่วน อย่างไรก็ดี การแยกเชื้อยังเป็นวิธีการที่จำเป็นต้องกระทำในการพิสูจน์ เพื่อให้ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคเพื่อประโยชน์หลักในแง่ของการป้องกันกำจัด นอกจากนั้นยังสามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ได้ เช่น การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อระบาดวิทยา การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อสาเหตุกับพืชอาศัย เป็นต้น สำหรับวิธีการแยกเชื้อนั้น มีด้วยกันหลายวิธี ขึ้นกับชนิดของเชื้อเป็นหลัก สำหรับในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ใช้หลักการแยกเชื้อจากชิ้นพืช (Pathogen isolation from plant parts)

วิธีดำเนินการในขั้นตอนของการแยกเชื้อต่อไป วิธีที่ใช้ในการแยกเชื้อจากชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคนั้นมีหลายวิธี จะเลือกใช้วิธีใดนั้น ขึ้นกับลักษณะของโรค และลักษณะของเชื้อสาเหตุเป็นสำคัญ ซึ่งในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ มีวิธีการแยกเชื้อสาเหตุโรคจากชิ้นพืช ภาพ 36



ภาพ 36 หลักการแยกเชื้อจากชิ้นพืช (Pathogen isolation from plant parts)

หมายเหตุ: โดยที่

ก คือ การนำใบข้าวที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ

ข คือ การฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ Clorox 10%

ค คือ เส้นใยเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อ

ง คือ เส้นใยที่เจริญบนอาหาร PDA

1. นำใบข้าวที่เป็นโรคมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ โดยจะตัดชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อพืชบริเวณที่คาบต่อระหว่างชิ้นส่วนที่เป็นโรคกับส่วนที่ไม่เป็นโรค ขนาด 0.5 × 0.5 cm

2. นำไปฆ่าเชื้อที่ผิว โดยแช่ Clorox 10% เป็นเวลา 5 นาที

3. นำชิ้นส่วนพืชมาล้างน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ซับให้ชิ้นส่วนพืชให้แห้งบนกระดาษที่ฆ่าเชื้อ

4. นำชิ้นส่วนพืชไปวางบนอาหาร PDA จานละ 4 ชิ้น บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3–5 วัน รอจนเส้นใยเชื้อราเจริญออกมาจากเนื้อเยื่อ

5. นำเชื้อรามาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่า เป็นเชื้อลักษณะตามที่ต้องการหรือไม่

6. จากนั้นเจาะบริเวณปลายเส้นใย ด้วย Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จานใหม่ เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

การเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์

ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ การเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์จะทำการถ่ายเชื้อลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และเลี้ยงเชื้อไว้ภายใต้อุณหภูมิที่เย็น ประมาณ 4°C เมื่อแยกเชื้อรา ที่ต้องการได้แล้วจะเก็บรักษาเชื้อโดยการทำการ Simple streak เชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเอียงใหม่ โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะที่เชื้อ แล้ว streak ลงบนอาหารใหม่ นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3–5 วัน เชื้อจะเจริญเต็มหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นก็นำเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 4°C

ภาคผนวก ข การศึกษาโครงสร้างของเชื้อรา โดยเทคนิค slide culture

การย้อมสีสปอร์

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทบยาโดยการศึกษาโครงสร้างของราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เทคนิค slide culture ซึ่งมีวิธีการทำดังต่อไปนี้

วิธีปฏิบัติ

1. เทอาหาร PDA ลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มม. ทิ้งไว้ให้เย็นและให้ผิวหน้าอาหารแห้ง 10 0%

2. ใช้มีดหรือมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 9566 แผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสมีความกว้างด้าน 6 มม.

3. ใช้ปากคีบๆสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟ 2 ครั้งแล้วจึงวางลงบนแท่งแก้วซึ่งงอเป็นข้อศอกในจานเพาะเชื้อ

4. ใช้มีดยกขึ้นวันที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสมาวางตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้

5. ใช้เพิ่มเขียเขี่ยรามาแตะที่ส่วนหนาทั้ง 4 ด้านของขึ้นวัน

6. นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95% และเผาไฟแล้วค่อยๆวางปิดชิ้นวันซึ่งปลูกเชื้อแล้ว

7. เทน้ำกลั่นซึ่งมี 20% glycerol ลงไปให้ชุ่มกระดาษหรืออาจจะใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้ออย่างเดียว

8. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบของกระจกปิดสไลด์

9. ยกกระจกปิดสไลด์ขึ้นหยดแอลกอฮอล์ 95% ลงไปที่ตรงกลางของกระจุกปิดสไลด์ด้านในซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยรา

10. ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้งนำกระจกปิดสไลด์วางลงบนน้ำยา lactophenol cotton blue ซึ่งหยุดตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่

11. เขียชิ้นวันสี่เหลี่ยมจัตุรัสออกทิ้งไปและหยดแอลกอฮอล์ 956 ลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยดน้ำยา lactophenol cotton blue ลงไปตรงกลางแผ่นสไลด์ก่อนแอลกอฮอล์แห้งสนิทปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่

12. นำสไลด์ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ทั้งสองแผ่นมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Potato Dextrose Agar (PDA) สูตรที่ 1

มันฝรั่งปอกเปลือกแล้ว	200.0 g
น้ำตาลกลูโคส	10.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1000.0 ml

1.1 ล้างมันฝรั่งให้สะอาด แล้วปอกเปลือกหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1 cm^3

1.2 ชั่งมันฝรั่ง 200 g ใส่ลงในหม้อเติมน้ำกลั่น ประมาณ 500 ml นำไปต้มให้เดือดนาน 5 นาที หรือจนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม

1.3 นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง หรือตะแกรงกรอง นำส่วนของเหลวมาเติมกลูโคสลงไป 10 g คนให้ละลาย ปรับ pH 5.4–5.6

1.4 ใส่ชั่งวุ้น 15 g ต้มให้เดือด ระหว่างทำการต้มจะต้องคนที่ก้นหม้อ เพื่อป้องกันวุ้นตกตะกอน และวุ้นไหม้ที่ก้นหม้อ

1.5 เมื่อวุ้นละลายดีแล้ว นำไปผสมกับน้ำต้มมันฝรั่งที่ผสมกลูโคสแล้ว ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 ml พร้อมผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

1.6 นำอาหาร PDA ที่ได้ไปเทใส่ขวด Media bottle ปิดฝาขวดพอหลวม ๆ

1.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave ภายใต้อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

1.8 นึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว นำอาหาร PDA เทอาหารลงในจานอาหารที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยวิธี Aseptic technique

1.9 รอให้อาหารแข็งตัว แล้วคว่ำจานอาหารลง เพื่อป้องกันหยดน้ำจากฝาจานอาหาร จากนั้นเขียนชื่อชนิดของอาหารที่ก้น เพื่อป้องกันการปนกันกับอาหารชนิดอื่น

2. Potato Dextrose Agar (PDA) สูตรที่ 2 อาหารสำเร็จ

Potato dextrose agar	39.0 g (ดูอัตราส่วนข้างขวด: 1000 ml)
Agar	5.132 g
Distilled water	1000.0 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายลงขวด media bottle ปิดฝาขวดพอหลวม ๆ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Auto clave ภายใต้อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ง การเตรียมสารเคมี

การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมี/สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การเตรียม 20mM Tris–HCl ปริมาณ 1 ml (stock 0.1 M) pH 8.0

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

$0.1\ M \times V_1 = 20\ mM \times 1\ ml$

$V_1 = [(20\times10^{-3}\ M) \times 1\ ml]/0.1\ M$

$V_1 = (0.02 \times 1\ ml)/0.1$

$V_1 = 0.2\ ml\ (200\ \mu l)$

1.2 การเตรียม 2mM EDTA ปริมาณ 1 ml (stock 0.5 M)

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

$0.5\ M \times V_1 = 2\ mM \times 1\ ml$

$V_1 = [(2\times10^{-3}\ M) \times 1\ ml]/0.5\ M$

$V_1 = (0.02 \times 1\ ml)/0.5$

$V_1 = 0.004\ ml\ (4\ \mu l)$

1.3 การเตรียม 1.2% Triton X –100 ปริมาณ 1 ml (stock 100%)

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

$100\% \times V_1 = 1.2\% \times 1\ ml$

$V_1 = (1.2\% \times 1\ ml)/100\%$

$V_1 = 0.012\ ml\ (12\ \mu l)$

1.4 การเตรียม 20mg/ml lysozyme ปริมาณ 1 ml (stock 200mg/ml)

จากสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$

$200mg/ml \times V_1 = 20mg/ml \times 1\ ml$

$V_1 = 20mg/ml \times 1\ ml/200mg/ml$

$V_1 = 0.1\ ml\ (100\ \mu l)$

1.5 การเตรียมตัวอย่าง 10ng DNA Template ปริมาณ 50 µl

ตัวอย่างการคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง DNA Template

กำหนดให้ ตัวอย่าง A มีความเข้มข้นโดยประมาณ 1 µg (load 3 µl)

3 µl = 1µg

ถ้า 1 µl = (1µg × 1 µl)/3 µl

= 0.33 µg/µl

เมื่อ n = 10^{-9} ดังนั้น 0.33 µg/µl = 330 ng/µl

ฉะนั้น จากสูตร M_1V_1 = M_2V_2

330ng/µl × V_1 = 10ng/µl × 50 µl

V_1 = 10ng/µl × 50 µl/330ng/µl

V_1 = 1.52 µl

ปรับปริมาณด้วย dH_2O 48.48 µl เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20°C

2. สารเคมี/สารละลายสำหรับการทำ Electrophoresis

2.1 การเตรียม 6X loading dye

Bromophenol blue	0.5%
Xylene cyanol	0.25%
Glycerol	30%

ผสมให้เข้ากัน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

2.2 การเตรียม 1 kp plus maker

1 kp	50 µl
6X loading (จากบริษัท)	80 µl
6X loading (จากการเตรียม)	30 µl

2.3 การเตรียม 1X TBE ปริมาณ 1 L

Tris–base	10.8 g
Boric acid	5.5 g
0.5M Na_2 EDTA (pH 8.0)	8 ml
ปรับปริมาณด้วย DI water	975.7 ml

2.4 การเตรียม สารละลาย 10% Ethidium Bromide (EtBr) (10mg/ml)

EtBr	10 µl
น้ำกลั่น	100 ml

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในภาชนะบรรจุแบบฝาเกลียว ห่อภาชนะภายนอกด้วยอะลูมินัมฟอยด์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง EtBr เป็นสารก่อมะเร็งที่มีพลังงานมาก และมีความเป็นพิษปานกลาง เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกาย ควรสวมถุงมือทุกครั้งเมื่อต้องทำงานที่เกี่ยวข้องกับสารเคมีชนิดนี้

2.5 การเตรียม 1% Agarose gel

Agarose powder	1 g
1X TBE	100 ml

ละลายเจลใน 1X TBE ด้วยความร้อน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง รอให้อุณหภูมิได้ประมาณ 60°C เติม EtBr ปริมาณ 20 µl ค่อย ๆ ผสมให้เข้ากันในภาชนะ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วเทลงบนชุดประกอบเจลที่มีใส่หวีเสียบ (comb) รอเจลเซตตัวประมาณ 15 นาที

3. การเตรียม 10X TBE buffer ปริมาณ 1 L

Tris–HCl	108 g
Boric acid	55 g
0.5M Na_2 EDTA (pH 8.0)	40 ml
ปรับปริมาณด้วย DI water	797 ml

4. การเตรียม Gel looding (6X)

Bromopenol biue	0.5 %
Xylene cyanol	0.25 %

ผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

5. การเตรียมสารละลาย Lactophenol Cotton Blue

Phenol crystal	20 g
Lactic acid	20 ml
Glycerine	40 ml
Cotton Blue	0.075 g
Distilled Water	20 ml

ผสมสารละลาย คนให้เข้ากันด้วยแท่งแก้วคนสาร และตั้งบนแท่นให้ความร้อน (hot plate) พอให้สารละลายอุ่น และไม่มีตะกอน Cotton Blue เหลืออยู่ ทิ้งให้เย็น แล้วจึงนำไปใช้

ภาคผนวก จ การวิเคราะการวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis

1. เตรียม Agarose ความเข้มข้น 0. 8 เปอร์เซ็นต์หรือ 1 เปอร์เซ็นต์โดยชั่ง Agarose ใน 1x TBE buffer จากนั้นนำไปต้มให้ละลายจนหมดตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องรอจนเจลอุ่นประมาณ 60 องศาเซลเซียส

2. ทำความสะอาดถาดเจลและหวีเสียบ (Comb) ด้วยน้ำกลั่นแล้วนำถาดเจลประกอบเข้ากับบล็อก

3. วางหวีเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจลเพื่อให้เกิดช่องเล็ก ๆ สำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่สนใจ

4. เท Agarose ลงบนถาดที่เตรียมไว้โดยให้มีความหนาประมาณ 3–5 มิลลิเมตรระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

5. นำถาด Agarose gel ออกจากบล็อกจากนั้นวางถาดลงในอ่าง Electrophoresis โดยให้ด้านที่มีหวีเสียบอยู่ทางขั้วลบแล้วเท 1X TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น Agrose gel โดยให้ระดับ 1X TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1–3 มิลลิเมตรดึงหวีเสียบออก

6. ผสม 6X loding dry เข้ากับตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบโดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแล้วค่อย ๆ หยอดลงในช่องที่เกิดจากหวีเสียบ

7. ปิดฝาอ่าง Electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าแล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าโดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวกใช้ความต่างศักย์ 80 โวลล์นาน 60–100 นาทีหรือเมื่อแถบสีด้านล่างของ 6X loding dry เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างของถาดประมาณ 1 เซนติเมตรแล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

8. ทำการย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น Agarose gel โปแช่ใน Ethidium bromide นาน 10 นาทีจากนั้นย้ายไปแช่น้ำสะอาดอีก 5 นาทีเพื่อล้าง Ethidium bromide ส่วนเกินออกนำแผ่น lrose gel ไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพ

ภาคผนวก ฉ หลักการในการเตรียมตัวอย่างสำหรับการเตรียมเพื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM

1. การเก็บตัวอย่าง (specimen collection) เป็นขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจากพืชหรือสัตว์โดยต้องคำนึงถึงลักษณะทางกายวิภาคที่มองเห็น (gross anatomy) ความชอกช้ำ (atraumatic) ความสะอาด (sterile technique) และขนาดของเนื้อเยื่อที่ทำการเก็บหลักการในทางปฏิบัติคือ

1. 1 ทำการเก็บตัวอย่างด้วยความรวดเร็วมากที่สุด

1. 2 ทำการล้างตัวอย่างในน้ำยาเช่น 0. 85% NaCl หรือ Ringer 's solution

2. การรักษาสภาพตัวอย่าง (fixation) เป็นขั้นตอนการคงสภาพของเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันการเกิดการเสื่อมสภาพ (tissue autolysis) ทำให้เนื้อเยื่อที่มีอยู่ในสภาวะ semi–fluid กลายเป็น semi–solid การทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพโดยเป็นกระบวนการทำให้โปรตีนซึ่งมีอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อเกิดความแข็งตัวสำหรับการทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพไม่นิยมใช้ความร้อน เพราะความร้อนสามารถทำลายของประกอบในเซลล์ (organelles) ได้น้ำยารักษาสภาพ (fixative solution) ที่ดีต้องมีคุณสมบัติที่ช่วยหยุดการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะการเสื่อมสภาพภายในเซลล์ได้อย่างรวดเร็วอันเป็นผลจากการแข็งตัวหรือตกตะกอนของโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (denature protein) โดยลักษณะของตัวอย่างต้องคำนึงถึงความต้องการในการศึกษาสภาพพื้นผิวของตัวอย่างนั้น ๆ

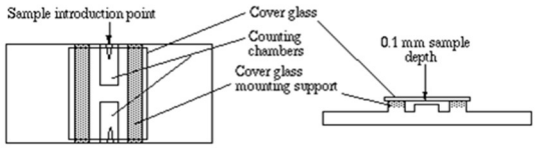
3. การขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) เป็นขั้นตอนดึงน้ำออกจากตัวอย่างเพื่อทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น ethyl alcohol หรือ acetone เทคนิคการสุ่มตัวอย่างเนื้อเยื่อลงในตัวทำละลายอินทรีย์เพื่อดึงน้ำออกนั้นจะต้องทำหลายครั้งโดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ขึ้นเรื่อย ๆ ทั้งนี้เพื่อให้ตัวทำละลายอินทรีย์มีเวลาการทำงานเพียงพอและทำให้เนื้อเยื่อตัวอย่างค่อย ๆ แห้งอย่างมีประสิทธิภาพ

4. การทำตัวอย่างให้แห้ง (Drying) (Critical point) โดยไม่ทำให้สภาพของพื้นผิวและความตึงผิวเปลี่ยนแปลงไปจากความเป็นจริง วิธีการนี้เริ่มจากการขจัดน้ำออกแล้วนำไปผ่านสารอินทรีย์เหลวซึ่งเป็น intermediate fluid เช่น Freon 113 ก่อนที่จะนำไปใส่ใน transitional fluid เช่น Freon 12 หรือ co, ซึ่งขั้นตอนสุดท้ายจะต้องทำในภาชนะพิเศษที่สามารถควบคุมความดันและอุณหภูมิได้ภาชนะนี้ เรียกว่า CPD Bomb หรือ Chamber ของเหลวอินทรีย์ขั้นสุดท้ายซึ่งขณะนี้ได้เข้าไปแทนที่ของเหลวภายในตัวอย่างและจะกลายเป็นไออย่างรวดเร็วหลังจากเพิ่มความดันและอุณหภูมิให้ถึงจุดวิกฤตของของเหลวที่ใช้เป็น transition fluid โดยจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงความตึงผิวของตัวอย่างผลที่ได้ คือ ตัวอย่างที่แห้งสนิทและพร้อมที่จะนำไปวางบนแผ่นตัวอย่าง (specimen stub) เพื่อที่จะนำไปผ่านขั้นตอนต่อไป

5. การฉาบผิวตัวอย่างด้วยโลหะหนัก (metal coating) นำตัวอย่างที่แห้ง จากขั้นตอน drying ไปวางบน Stub โดยใช้กาวเป็นตัวเชื่อมผิวล่างของตัวอย่างให้ติดอยู่บนผิวของ stub เรียกว่าขั้นตอน mounting โดยกาวที่ใช้จะต้องมีโลหะผสมหรือต้องเป็นสารตัวนำไฟฟ้าเช่น ผงถ่านที่ผสมในกาว เรียกว่า carbon colloidal adhesive หลังจากขั้นตอน mounting แล้วจะต้องนำตัวอย่างพร้อม stub ไปฉาบผิวด้วยโมเลกุลของโลหะ (metal coating) ใน vacuum evaporator หรือ sputtering unit การ coating เริ่มต้นด้วยการฉาบคาร์บอนเพื่อเพิ่มการนำของไฟฟ้า จากนั้นทำการฉาบด้วยทองผสมพาลาเดียม (gold–palladium) ความหนาของแผ่นโมเลกุลของโลหะรวมกันแล้วไม่ควรเกิน 15 นาโนเมตร ตัวอย่างที่ผ่านการเคลือบทองผสมพาราเดียมแล้วพร้อมที่จะนำไปศึกษาภายใต้กล้อง SEM ได้ทันที

ภาคผนวก ช การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Haemacytometer

Haemacytometer ภาพ 24 เป็นแผ่นสไลด์แก้วที่มีความหนากว่าสไลด์แก้วธรรมดา และมีตารางเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ 9 ช่อง ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ซึ่งเป็น Scale ตรวจนับเซลล์เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย ซึ่งในแต่ละช่องมีพื้นที่ 1 mm^2 เมื่อปิดด้วย cover glass เฉพาะของมันในตำแหน่งที่ถูกต้อง จะให้ความลึก 0.1 mm ดั้งนั้นปริมาตรใน 1 ช่องตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส เท่ากับ 0.1 mm^3 เท่ากับ $n \times 10^4$ เมื่อ n คือ จำนวนเซลล์ที่นับได้ใน 1 ช่อง การนับจำนวนเซลล์ ควรนับทั้ง 5 ช่อง เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องมากขึ้น



ภาพ 37 Haemacytometer

ที่มา: iGEM Concordia, 2014, Online

การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโดยใช้ Haemacytometer

ขั้นตอนการใช้งาน Haemacytometer

1. วาง Cover glass บน Haemacytometer อย่าให้มีฟองอากาศซึ่งแผ่น Cover glass จะอยู่เหนือผิวตาราง 0.1 mm

2. ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำตัวอย่างมา 9–10 µl

3. วางปลายปิเปตให้ใกล้ขอบ Cover glass บน Haemacytometer จากนั้นค่อย ๆ หยดน้ำตัวอย่างลงไป ซึ่งน้ำจะไหลเข้าไปใต้ Cover glass เองจนเต็มพื้นที่ตาราง (หยดทั้ง 2 ตาราง)

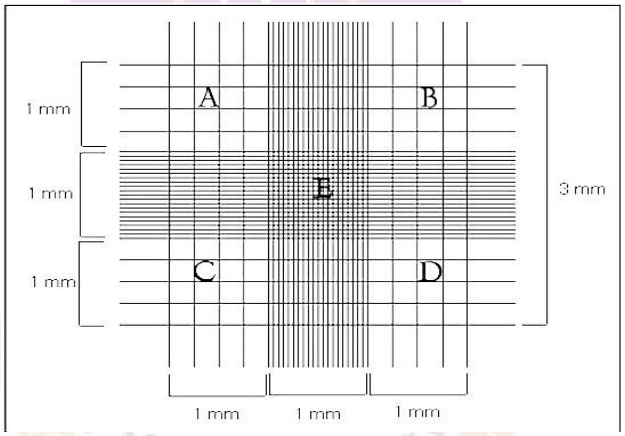
4. หากหยดน้ำตัวอย่างมากเกินไป จะเลอะล้น Cover glass แต่ถ้าหยดน้ำตัวอย่างน้อยเกินไป ก็จะไม่ไหลเข้าเต็มพื้นที่ตาราง จึงต้องล้าง และหยดใหม่

การนับปริมาณเชื้อตัวอย่างด้วย Haemacytometer

1. เมื่อน้ำตัวอย่างไหลเข้าใต้ Cover glass จนเต็มพื้นที่ตาราง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40X และ 100X

2. จะเห็นตารางปรากฏบน Haemacytometer มีทั้งหมด 25 ช่องใหญ่ ใน 1 ช่องใหญ่จะมีตารางเล็ก ๆ ภายใน อีก 16 ช่องเล็ก

3. นับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในช่องใหญ่ 5 ช่อง ถ้ามีเซลล์อยู่ตรงขอบของตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสพอดี ให้นับเซลล์ที่อยู่ตรงขอบบน และเส้นขอบด้านซ้ายรวมกับเซลล์ในช่อง แต่จะไม่นับเซลล์ที่อยู่ตรงเส้นขอบล่าง และเส้นขอบขวา ตรงเส้นขอบสี่เหลี่ยมนั้น จะมี 3 เส้น โดยเส้นตรงกลางเป็นเส้นของพื้นที่ตาราง ส่วนเส้นนอก และเส้นใน มีไว้เพื่อให้ง่ายต่อการตัดสินใจว่า เซลล์ของเชื้อจะอยู่นอก หรือในพื้นที่ช่องนับ



ภาพ 38 บริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C, D และ E

ที่มา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา, 2555, สื่อออนไลน์

การเลือกนับช่อง

การเลือกนับช่องใหญ่ จะให้ค่าที่แม่นยำกว่าช่องเล็ก เนื่องจากช่องใหญ่มีพื้นที่มากกว่า แต่ถ้าในกรณีเชื้อตัวอย่างมีความหนาแน่นสูงมาก การนับในช่องใหญ่อาจจะใช้เวลามาก สามารถเลือกนับในช่องเล็กได้ ในการนับสปอร์นั้น ควรจะนับประมาณ 5 ขึ้นไป แล้วหาค่าเฉลี่ยภายหลัง ทั้งนี้ เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จะนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย

2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400$ mm^2

3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก1/10 mm) จะเท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400 \times 1/10$ mm^3 หรือ 0.1 mm^3

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 mm^3

5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 cm^3 หรือ 1 mm ซึ่ง 1 mm = 1000 mm^3

ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 mm^3 นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

ถ้าใน 1000 mm^3 (1 ml) จะมีสปอร์ = $Y \times 1000 \times 1/0.1$ สปอร์

= $Y \times 1 \times 10^4$ spore/ml

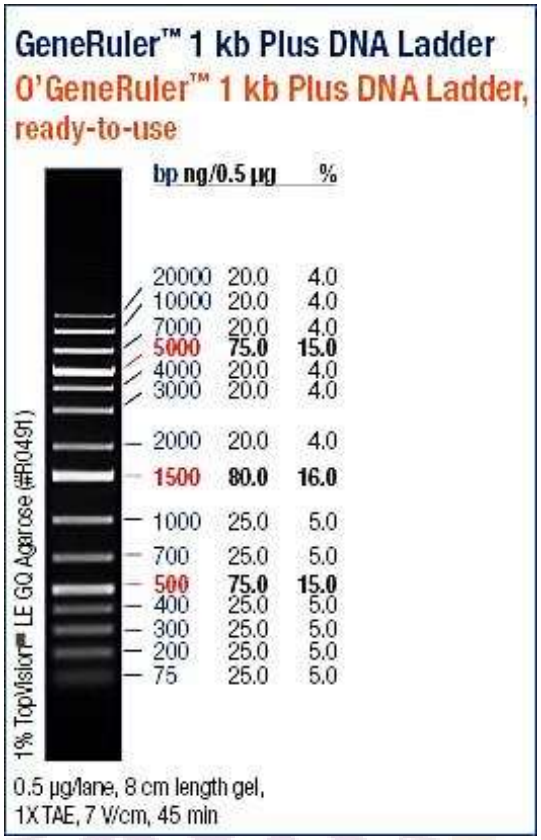
6. ในกรณีสปอร์ หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A, B, C, D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์

ดังนั้น ความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 ml = $Z/5 \times 1 \times 10^4$ spore/ml

7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5–10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือเซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ dropper หรือ loop หรือ suspension ของเชื้อลงบน scale ของ Haemacytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ cover slip ปิดทับ กดเบา ๆ หากใส่หยดของ spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้น โดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง 10^5–10^6 spore/ml เป็นต้น

ภาคผนวก ซ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน Generuler 1 kb plus DNA Ladder (invitrogen™)



ภาพ 39 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder

ที่มา: fisher Scientific, n.d., Online

ภาคผนวก ฌ ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลายในลำไย ระดับห้องปฏิบัติการ

ตาราง 10 ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลาย ระดับห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	การเกิดโรคบนกล่องของแต่ละชุดการทดลอง				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5
ไอโซเลท 1	25.00	25.00	16.67	16.67	16.67
ไอโซเลท 2	16.67	16.67	25.00	16.7	25.00
ไอโซเลท 3	25.00	25.00	25.00	33.33	33.33
ไอโซเลท 4	33.33	41.67	33.33	25.00	25.00
ไอโซเลท 5	16.67	25.00	25.00	33.33	33.33
ไอโซเลท 6	33.33	33.33	25.00	41.67	33.33
ไอโซเลท 7	41.67	41.67	41.67	25.00	33.33
ไอโซเลท 8	25.00	16.67	16.67	41.67	33.33
ไอโซเลท 9	25.00	25.00	33.33	16.67	25.00
ไอโซเลท 10	8.33	25.00	25.00	25.00	16.67
ไอโซเลท 11	25.00	25.00	33.33	33.33	41.67
ไอโซเลท 12	33.33	41.67	25.00	33.33	41.67
ไอโซเลท 13	33.33	41.67	33.33	33.33	25.00
ไอโซเลท 14	33.33	50.00	33.33	58.33	41.67
ไอโซเลท 15	50.00	41.67	41.679	33.33	41.67
ไอโซเลท 16	41.67	50.00	33.33	50.00	41.67
ไอโซเลท 17	58.33	58.33	50.00	66.67	58.33
ไอโซเลท 18	50.00	41.67	33.33	33.33	41.67
ไอโซเลท 19	41.67	50.00	33.33	41.67	33.33
ไอโซเลท 20	33.33	41.67	50.00	33.33	50.00
ชุดควบคุม	16.67	0	0	0	0

ภาคผนวก ญ ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลายในลำไย ระดับแปลงทดลอง

ตาราง 11 ผลการทดสอบความสามารถที่ทำให้เกิดโรคผลลาย ระดับแปลงทดลอง

ไอโซเลท	การเกิดโรคบนแปลงทดลองของแต่ละชุดการทดลอง				
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5
ไอโซเลท 1	35	30	45	50	50
ไอโซเลท 2	30	20	25	30	25
ไอโซเลท 3	35	25	40	30	40
ไอโซเลท 4	35	35	25	25	35
ไอโซเลท 5	45	35	50	55	55
ไอโซเลท 6	35	40	50	50	50
ไอโซเลท 7	45	40	25	20	25
ไอโซเลท 8	30	40	35	35	55
ไอโซเลท 9	55	45	40	35	45
ไอโซเลท 10	50	35	40	40	40
ไอโซเลท 11	25	40	45	40	35
ไอโซเลท 12	50	40	50	50	45
ไอโซเลท 13	45	45	30	25	35
ไอโซเลท 14	45	35	50	50	45
ไอโซเลท 15	45	40	45	60	35
ไอโซเลท 16	45	45	60	60	60
ไอโซเลท 17	60	65	75	70	55
ไอโซเลท 18	45	35	50	55	55
ไอโซเลท 19	45	55	35	45	45
ไอโซเลท 20	60	50	55	45	50
ชุดควบคุม	0	0	10	0	0

ภาคผนวก ฎ นิยามศัพท์เฉพาะ

Dimocarpus longan Lour.	คือ ผลไม้ มีชื่อเรียกทางพื้นบ้านภาคเหนือว่า “บ่าลำไย” หรือลำไย มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Longan อยู่ในวงศ์ Sapindaceae เป็นพืชไม้ผลเขตร้อนและกึ่งร้อน เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้นสีน้ำตาล ออกดอกเป็นช่อ สีขาวครีม ผลทรงกลมเป็นช่อ ผลดิบเปลือกสีน้ำตาลอมเขียว ผลสุกสีน้ำตาลล้วน เนื้อลำไยสีขาวหรือชมพูอ่อน เมล็ดสีดำเป็นมัน เนื้อล่อนเม็ด
Fruit Discoloring	คือ ลักษณะอาการผลลาย ผิวจะมีจุดสีดำขนาด1–2 มิลลิเมตร พบทั้งด้านในและด้านนอกผล บางจุดมีขนาดใหญ่เป็นปื้น กระจายอยู่ทั่วผล ทำให้มีสีลายกระ
Tissue transplant	คือ วิธีการแยกหาเชื้อสาเหตุโดยวิธีแยกเชื้อจากเนื้อเยื่อที่เป็นโรค
Systematic random sampling	คือ วิธีสุ่มแบบเป็นระบบ เป็นการสุ่มตัวอย่างจากหน่วยย่อยของประชากรที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยสุ่มเป็นช่วงๆ
Scanning electron microscope (SEM)	คือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีกำลังขยาย สูงสุดประมาณ 10 นาโนเมตร จะใช้ในการศึกษาสัณฐาน และรายละเอียดของลักษณะพื้นผิวของตัวอย่าง ภาพที่ได้จากการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่สะท้อนจากผิวหน้าของตัวอย่างที่ได้สำรวจ จะเป็นภาพในลักษณะ 3 มิติ
Polymerase Chain Reaction (PCR)	คือ กระบวนการในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA) ในหลอดทดลอง โดยวิธีการได้เลียนแบบมาจากการสังเคราะห์ (DNA) ในสิ่งมีชีวิต

Loop mediated amplification (LAMP)	คือ กระบวนการเพิ่มขยายยีน สามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียว คือ ประมาณ 60–65 องศาเซลเซียส และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล กนกวรรณ เหรา

วัน เดือน ปี เกิด 11 มกราคม 2536

ที่อยู่ปัจจุบัน 93 หมู่ 2 ตำบลสบเปิง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่

ที่ทำงานปัจจุบัน เอ็นจิเนียริ่ง ดีไซน์ คอนซัลแตนส์ จำกัด

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2557 วท.บ. (จุลชีววิทยา), มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา

ผลงานตีพิมพ์

ที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

กนกวรรณ เหรา, วีระชัย ตีรอรุณศิริ และสุภัค มหัทธนพรรค (ผู้บรรยาย). (31 พฤษภาคม 2562). การระบุเชื้อสาเหตุโรคผลลายในลำไยโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR). ใน **การประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ราชธานีวิชาการ ครั้งที่ 4** (หน้า 1–11). อุบลราชธานี: มหาวิทยาลัยราชธานี

ผลงานตีพิมพ์อื่น ๆ –