การผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอ [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] พันธุ์ทับทิมสยาม

Production of Disease-Free Planting Materials of Pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] cv. Tup Tim Siam

พิมพา พงศ์พัฒนบุตร

Pimpa Pongpattanabut

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Plant Pathology
Prince of Songkla University
2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอ [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] พันธุ์ทับทิมสยาม

ผู้เขียน นางสาวพิมพา พงศ์พัฒนบุตร

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุดี)

คณะกรรมการสอบ

……ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุดี)

……กรรมการ

(นางสุรภี กีรติยะอังกูร)

……กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

……

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ_____

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุดี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ_____

(นางสาวพิมพา พงศ์พัฒนบุตร)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ_____

(นางสาวพิมพา พงศ์พัฒนบุตร)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอ [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] พันธุ์ทับทิมสยาม

ผู้เขียน นางสาวพิมพา พงศ์พัฒนบุตร

สาขาวิชา โรคพืชวิทยา

ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

คัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูกที่สมบูรณ์ และไม่มีอาการของโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิง จากสวนส้มที่มีอายุต้น 4 ปี และสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ในเขต ตำบลคลองน้อย อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช แบ่งต้นที่คัดเลือกได้ในแต่ละสวนเป็น 2 กลุ่มกลุ่มแรกตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิง โดยใช้เทคนิคอีไลซ่า และพีซีอาร์ ตามลำดับ กลุ่มสองไม่มีการตรวจเชื้อ ผลการตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัสในต้นส้มโอในแปลงปลูกของกลุ่มตรวจโรคจากสวนอายุ 4 ปี และสวนอายุ 8 ปี คิดเป็น 35% (7/20 ต้น) และ 25% (5/20 ต้น) ตามลำดับ และพบเชื้อฮวงลองบิงของต้นส้มในแปลงปลูกกลุ่มตรวจโรคจากสวนอายุ 4 ปี คิดเป็น 5% (1/20 ต้น) แต่ตรวจไม่พบเชื้อชนิดนี้ในต้นส้มที่คัดเลือกเป็นกลุ่มตรวจโรคจากสวนอายุ 8 ปี ตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกกลุ่มผ่านการตรวจแล้วไม่พบเชื้อ และจากต้นในกลุ่มไม่ผ่านการตรวจเชื้อจากสวนที่มีอายุต้นแตกต่างกันคือ 4 และ 8 ปี เมื่อกิ่งตอนมีอายุ 45 วัน ย้ายลงถุงและปลูกเลี้ยงให้เป็นต้นแม่พันธุ์ในโรงเรือนตาข่ายกันแมลง ผลการตรวจโรคบ่งชี้ว่าต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนปลอดจากโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิงจำนวนทั้งสิ้น 253/254 ต้น และพบต้นแม่พันธุ์ติดเชื้อฮวงลองบิงเพียงชนิดเดียวจำนวน 1/44 ต้น จากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกกลุ่มที่ไม่ตรวจเชื้อที่มีอายุ 8 ปี สำหรับอัตรารอดของกิ่งตอนที่ใช้ผลิตต้นแม่พันธุ์จากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี สูงกว่าการตอนจากต้นที่มีอายุ 8 ปี คือ 77% และ 50% ตามลำดับ เมื่อนำตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งเจริญมาจากกิ่งตอนมาผลิตกิ่งพันธุ์โดยวิธีการติดตา พบว่าการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ซึ่งผ่านการตรวจโรคและติดบนต้นตอทองดี ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 25 ต้นต่อ 25 ตา แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ตาจาก

ต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 4 ปี นอกจากนี้พบว่าการใช้ต้นตอทับทิมสยามและต้นตอทองดีในการผลิตกิ่งพันธุ์มีผลต่ออัตราการรอดของตาไม่แตกต่างกัน รวมกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้จากการทดลองครั้งนี้ 163 ต้น ทั้งหมดปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา และเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง 100% เมื่อตรวจเชื้อด้วยเทคนิคอีไลซา และพีซีอาร์ตามลำดับ

Thesis Title Production of Disease-Free Planting Materials of Pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] cv. Tuptim Siam

Author Miss Pimpa Pongpattanabut

Major Program Plant Pathology

Academic Year 2012

Abstract

Field trees of pomelo [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] cv. Tup Tim Siam were selected from two orchards of planting age, 4 and 8 years, at Tumbon Klong Noi, Amphoe Phagphanang, Changwat Nakornsrithammarat. Selections were based on the trees free from citrus tristeza virus (CTV) and huanglongbing (HLB) diseased symptoms. Selected trees from each orchard were divided into two groups. The first group was assayed for CTV and HLB causal pathogens by ELISA and PCR, respectively and the second group was not tested. CTV was detected in the 4 and 8 year field trees at 35% (7/20 trees) and 25% (5/20 trees), respectively. In contrast, HLB pathogen was only found in the 4 year trees at 5% (1/20 trees) but not in the 8 year trees. Later, marcotts were propagated from the pathogen-free tested field trees and the untested trees. Rooted marcotts of 45 day old were transplanted and cultivated under insect proved net house in order to produce mother plants. Results from pathogen detection indicated that the total of 253/254 mother plants were free from CTV and HLB diseases. However, 1/44 of mother plant propagated from the untested 8 year field tree became infected with HLB. In addition, marcott survival rate produced from the 4 year trees (77%) was higher than of which from 8 year trees (50%). When nursery trees (planting material) were propagated by budding on rootstock, the highest production rate, 25 trees per 25 budwoods, was obtained from a treatment of budwood from mother trees produced from 8 year disease free field trees budded on Tong Dee rootstock. However, it was not statistically different from treatments using budwood collected from mother trees produced from 4 year field trees. Moreover, survival rates of budwood budded on Tup

Tim Siam or Tong Dee rootstock were not different. Total of 163 nursery trees were propagated and they were 100% free from tristeza and huanglongbing disease as tested by ELISA and PCR, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รัตนา สดุดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการดำเนินงานวิจัย การเขียนและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดีตลอดมา ทำให้ผู้วิจัยได้รับความรู้อันเป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วสันณ์ เพชรรัตน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ คุณสุรภี กีรติยะอังกูร และรองศาสตราจารย์ ดร.สมปอง เตชะโต กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไข้ข้อบกพร่อง ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาการจัดการศัตรูพืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยนี้ และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่างๆ และวิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากโครงการวิจัยการผลิตต้นแม่พันธุ์และกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ขอขอบคุณ คุณวันชาติ บุญมณี ที่ได้ให้คำแนะนำในด้านการผลิตกิ่งพันธุ์โดยการตอนกิ่งและการติดตา คุณพจชนาจ ทับบุรี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทางด้านเทคนิคชีวโมเลกุล คุณวิรัช สุขแสง และคุณสมพร ณ นคร ที่ได้อนุเคราะห์สวนส้มโอในการทำวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ด้วยความเคารพยิ่ง ตลอดจนผู้มีพระคุณ และคณาจารย์ ผู้ให้วิชาความรู้แก่ผู้วิจัยจนได้มีโอกาสทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จ ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ สนับสนุน ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

พิมพา พงศ์พัฒนบุตร

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	10
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	11
วัสดุและอุปกรณ์	11
วิธีการดำเนินการ	20
3. ผล	23
4. วิจารณ์	39
5. สรุป	41
เอกสารอ้างอิง	43
ภาคผนวก	49
ภาคผนวก ก	50
ภาคผนวก ข	53
ภาคผนวก ค	60
ประวัติผู้เขียน	69

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อฮวงลองบิง *Candidatus* Liberibacter *asiaticus*	6
2.	ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 1-15	24
3.	ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 16-20	24
4.	ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสตเตซาไวรัสจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 1-20	26
5.	ผลการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยวิธีการตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูก	31
6.	ผลการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยวิธีการติดตา	33
7.	ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามผลิตโดยการติดตาบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม	35
8.	ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามผลิตโดยการติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี	36

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1.	ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจโรค	53
2.	ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ไม่มีการตรวจโรค	55
3.	ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากการตอนกิ่งของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจโรค	57
4.	ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากการตอนกิ่งของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ไม่มีการตรวจโรค	58

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

5. ANOVA (Analysis of variance) ปัจจัยการตอนกิ่งส้มโอทับทิมสยาม 59

6. ANOVA (Analysis of variance) ปัจจัยการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอทับทิมสยาม 59

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ขั้นตอนการตอนกิ่งพืชโดยทั่วไป	9
2.	ต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดีใช้ในการผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค	14
3.	ต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามใช้ในการผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค	15
4.	ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 1-15	25
5.	ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 16-20	25
6.	ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 1-5	27
7.	ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 6-10	27
8.	ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 11-15	28
9.	ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 16-20	28
10.	ต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูกที่ได้รับคัดเลือกเพื่อใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์โดยวิธีการตอนกิ่ง	29

ภาพที่ **หน้า**

11. ต้นแม่พันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามอายุ 6 เดือน เจริญจากกิ่งตอนจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อและไม่มีการตรวจเชื้อ (ซ้าย) และจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อและไม่มีการตรวจเชื้อ (ขวา) ปลูกเลี้ยงในโรงเรือนตาข่ายกันแมลง 31
12. การเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามปลอดโรคหลังจากติดตาบนต้นตอเป็นระยะเวลาต่างๆ 34
13. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากกิ่งติดตาส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 37
14. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากกิ่งติดตาส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามบนต้นตอส้มโอทองดี 38

ภาพภาคผนวกที่ **หน้า**

1. คำนวณค่า cut-off ตามวิธีการของ Bioreba, (2011) ในการวิเคราะห์ผลการติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาของต้นส้มโอในแปลงปลูก 60
2. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 60
3. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 61
4. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 61
5. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 62
6. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 62

ภาพภาคผนวกที่ **หน้า**

7. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 63
8. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 63
9. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 64
10. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 64
11. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 65
12. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 65
13. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 66
14. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 66
15. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 67
16. ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม 67
17. คำนวณค่า cut-off ตามวิธีการของ Bioreba, (2011) ในการวิเคราะห์ผลการติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาของกิ่งพันธุ์ส้มโอที่ผลิตได้ 68

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] จัดเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญของประเทศไทย จังหวัดที่มีการผลิตส้มโอมากที่สุด ได้แก่ สมุทรสงคราม พิจิตร ชุมพร นครศรีธรรมราช และกาญจนบุรี ทั้งประเทศมีพื้นที่ปลูกส้มโอที่ให้ผลผลิตแล้วประมาณ 200,987 ไร่ ให้ผลผลิต 305,500 ตัน คิดเป็นผลผลิตประมาณ 1,578 กิโลกรัมต่อไร่ มีการส่งออกส้มโอสดประมาณ 12,000 ตัน ซึ่งคิดเป็นเงินมูลค่า 100 ล้านบาท เป็นส่วนแบ่งตลาดโลก 1.08% ส่วนการค้าโลก (World Trade Atlas) มีการซื้อขายประมาณ 1,110 ล้านตัน คู่ค้าที่สำคัญของส้มโอ ได้แก่ ฮ่องกง แคนาดา จีน และสิงคโปร์ ตลาดต่างประเทศที่สำคัญ ได้แก่ ประเทศมาเลเซีย พม่า อินโดนีเซีย สิงคโปร์ ฟิลิปปินส์ อเมริกา ฮ่องกง แคนาดา และยุโรป ปัจจุบันตลาดต่างประเทศเริ่มขยายไปทางตะวันออกกลาง เช่น บาร์เรน ซาอุดิอาราเบีย คูเวต และโอมาน ซึ่งส้มโอเป็นที่นิยมของตลาดต่างประเทศนั้นมีอยู่ 3 สายพันธุ์ด้วยกัน คือ พันธุ์ขาวหอม ขาวน้ำผึ้ง และขาวทองดี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2552) จังหวัดนครศรีธรรมราช มีพื้นที่ปลูกส้มโอทั้งหมด 4,604 ไร่ ให้ผลผลิตโดยรวมประมาณ 2.7 ล้านผล โดยปลูกส้มโอพันธุ์ขาวทองดีเป็นหลักและกำลังขยายพื้นที่ปลูกส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อการส่งออก ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามมีพื้นที่ปลูกอยู่เฉพาะในจังหวัดนครศรีธรรมราชเขตลุ่มน้ำปากพนังอันเนื่องมาจากพระราชดำริ แต่การผลิตส้มในประเทศไทยประสบปัญหาเกี่ยวกับต้นโทรมหลังจากปลูกไปแล้ว 4-5 ปี หรือหลังจากให้ผลผลิตไปแล้ว 1-2 ปี ทำให้ต้นส้มมีผลผลิตลดลง ซึ่งสาเหตุอาการโทรมของส้มโอนั้นเกิดจากเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส และ ฮวงลองบิงแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ (สุดาวรรณ มีเจริญ และคณะ, 2550) ปัจจุบันพบว่าการแพร่ระบาดของโรคทั้งสองรุนแรงขึ้นในแปลงปลูกส้มโอหลายจังหวัดของประเทศไทย (รัตนา สดุดี และคณะ, 2552; ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล, 2552) เนื่องจากโรคทั้งสองมีเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยไก่แจ้เป็นแมลงพาหะในการแพร่กระจายเชื้อ การควบคุมและการกำจัดพาหะโดยใช้สารเคมีจะทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้โรคทั้งสองยังสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีการขยายพันธุ์ เช่น การติดตาหรือทาบกิ่ง และสามารถติดไปกับกิ่งพันธุ์ส้ม (ลัดดาวัลย์ สมเพาะ และคณะ, 2550)

ดังนั้นการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มปลอดโรคของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามเพื่อปลูกทดแทนต้นที่เป็นโรคในแปลงเป็นการหลีกเลี่ยงการนำโรคทั้งสองชนิดเข้าสู่แปลงปลูกและลดการแพร่กระจายของโรค การใช้กิ่งพันธุ์ปลอดโรคจึงเป็นวิธีการที่สำคัญในการจัดการโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิงของพืชตระกูลส้ม

2. การตรวจเอกสาร

โรคทริสเตซา

โรคทริสเตซาเป็นโรคที่มีผลกระทบต่อการผลิตส้ม มีต้นกำเนิดอยู่ในเอเชีย และได้แพร่กระจายไปยังประเทศอื่นๆ โดยการติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ และมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะในการแพร่กระจาย โรคนี้เป็นสาเหตุการตายของส้ม 10 ล้านต้นในอาร์เจนตินาในปี ค.ศ. 1945 และเพิ่มขึ้นเป็น 18 ล้านต้น ในปี ค.ศ. 1959 ในบราซิลมีรายงานการตายมากกว่า 10 ล้านต้นในปี ค.ศ. 1958 ส่วนในสเปน และเวเนซูเอลา มีรายงานการเข้าทำลายประมาณ 16 ล้านต้น (Rocha-Pena *et al*., 1995) และโรคยังทำลายต้นส้มที่ใช้ต้นตอจาก sour orange หลายล้านต้น ส่วนในประเทศไทยมีรายงานโรคทริสเตซาเกิดขึ้นกับส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มตรา และมะนาว ซึ่งอาการของโรคจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของไวรัส และชนิดของส้ม (รัตนา สดุดี, 2537)

โรคทริสเตซามีสาเหตุมาจากเชื้อ Citrus tristeza *Closterovirus* (CTV) ซึ่งจะอาศัยอยู่เฉพาะในเซลล์ท่ออาหารของพืช จัดอยู่ใน genus *Closterovirus* มีรูปร่างเป็นแบบท่อนยาวคด (long flexuous rod) ขนาดประมาณ 11× 2000 นาโนเมตร มีอนุภาคเป็นอนุภาคเดี่ยว สารพันธุกรรมเป็นแบบ single-stranded RNA (ssRNA) จีโนมมีความยาวประมาณ 20 กิโลเบส (Bekolo *et al*., 2007) สามารถถ่ายทอดได้โดยมีเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (brown citrus aphid: *Toxoptera citricida* Kirkaldy) ซึ่งเป็นพาหะหลักในการแพร่กระจายไวรัส แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้ม มีกลไกในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทริสเตซาเป็นแบบ semi-persistent คือเพลี้ยอ่อนส้มจะสามารถดูดรับเชื้อไวรัสจากอาหารซึ่งเป็นน้ำเลี้ยงของพืชที่ติดเชื้อไวรัส โดยใช้ระยะเวลานาน 30 นาที และใช้เวลาในการดูดกินเพื่อถ่ายทอดเชื้อไวรัสไปยังพืชปกตินาน 30 นาทีเช่นกัน (Komazaki, 1993) และมีรายงานว่าเชื้อทริสเตซาไวรัสสามารถถ่ายทอดโดยวิธีการ graft ใน Maxican lime และ Grape fruit ซึ่งจะแสดงอาการภายใน 3 สัปดาห์ ถึงแม้ว่าการ graft จะไม่ประสบผลสำเร็จ (Rocha-pena *et al*., 1993)

ลักษณะอาการของโรคทริสเตซาในส้มจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อไวรัส และสายพันธุ์ของส้ม (รัตนา สดุดี, 2537) ในเอเชียพบสายพันธุ์ของเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส ได้แก่ สายพันธุ์ต้นกล้าเหลือง seeding yellows, (CTV-SY) สายพันธุ์ต้นโทรม tristeza decline (CTV-TD) หรือ quick decline, (CTV-QD) สายพันธุ์ลำต้นบุ๋ม stem pitting, (CTV-SP) และสายพันธุ์อ่อน mild strain (NPPO, 2009) โดยทั่วไปเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซาทำให้เกิดอาการของโรคที่เด่นชัด เช่น อาการเส้นใบใสเมื่อส่องดูด้วยแสงจะเห็นเป็นขีด โปร่งใสสั้นๆ ใบโค้งงอเป็นรูปถ้วย แคระแกรน ใบเหลือง กิ่งแห้งตายจากส่วนปลาย เมื่อลอกเปลือกดูจะเห็นอาการลำต้นบุ๋ม

อาการต้นกล้าเหลือง มะนาว และส้มเขียวหวานจะแสดงอาการโทรม เหี่ยว และยืนต้นตาย (อำไพวรรณ ภราดร์นุวัตน์ และสุพัฒน์ อรรถธรรม, 2528; Niblett *et al*., 2000) ส่วนในส้มโอนั้นจะแสดงอาการใบเป็นจ้ำๆ สีเขียว เส้นใบแตกนูน กิ่งแห้งตายจากปลายยอด รัตนา สดุดี และคณะ (2552) ศึกษาผลกระทบของเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ลำต้นบุ๋มของพืชตระกูลส้ม โดยได้สำรวจโรคของส้มระหว่างปี พ.ศ. 2547-2552 พบการระบาดของโรคทริสเตซาไวรัสทั่วประเทศไทย และพบการติดเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ลำต้นบุ๋ม (CTV-SP) ในส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน ส้มโอเชียน ส้มโอ และมะนาว ซึ่งทำให้เกิดอาการร่องบุ๋มที่ลำต้นหลัก กิ่ง ต้นส้มแคระแกรน โทรมและกิ่งแห้งตายจากปลายยอด

โรคฮวงลองบิง

โรคฮวงลองบิง (Huanglongbing, HLB) หรือโรคยอดเหลือง (yellow shoot disease) หรือในอดีตเป็นที่รู้จักกันในชื่อโรคกรีนนิ่ง (greening disease) ในประเทศจีนมีชื่อว่า “yellow dragon disease” แปลเป็นภาษาไทยว่าโรคมังกรเหลือง (Bove, 2006) มีรายงานครั้งแรกจากทางใต้ของประเทศจีนในช่วงปลายศตวรรษที่ 19 โรคนี้ได้กระจายอยู่ในสามภูมิภาคใหญ่ ๆ ของโลก ได้แก่ ภูมิภาคเอเชีย แถบแอฟริกาตะวันออก และคาเมรูนในแอฟริกาตะวันตกตลอดจนถึงมาดากัสการ์ รูเนียน และหมู่เกาะมอริเชียส และแถบตะวันตกเฉียงใต้ของคาบสมุทรอาหรับ โรคฮวงลองบิงมีรายงานในรัฐเซาเปาโลของประเทศบราซิลในปี ค.ศ. 2004 และรัฐฟลอริดาของสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2005 (Hansen *et al*., 2008; Teixeira *et al*., 2008) ฮวงลองบิงเป็นโรคที่สำคัญและทำความเสียหายกับพืชตระกูลส้มเป็นที่รู้จักกันนานหลายปีในเอเชีย และแอฟริกา (da Graca *et al*., 2008) ส่วนในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2516 (ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล, 2552)

โรคฮวงลองบิงเกิดจากแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) ที่อาศัยอยู่ในท่ออาหาร (phloem sieve tubes) ของพืช จัดอยู่ในจีนัส *Candidatus* Liberibacter ใน alpha subdivision ของ *Proteobacteria* มี 3 สายพันธุ์ คือ *Ca.* L. *asiaticus* พบในเอเชีย รัฐเซาเปาโลของประเทศบราซิล และรัฐฟลอริดาของสหรัฐอเมริกา *Ca*. L. *africanus* พบในแอฟริกา และ *Ca*. L. *americanus* เป็นสายพันธุ์ที่พบในรัฐเซาเปาโลของประเทศบราซิล ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับที่พบในเอเชีย (Teixeira *et al*., 2008) ในธรรมชาติ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงสามารถถ่ายทอดได้โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (psyllids) ที่สำคัญมีอยู่ 2 ชนิด คือ *Diaphorina citri* (Kuwayama) เป็นพาหะของเชื้อ *Ca*. L. *asiaticus* พบในเอเชียและอเมริกา และ *Trioza erytreae*

(Del Guercio) ซึ่งเป็นพาหะของ *Ca*. L. *africanus* พบในแอฟริกา (Lin *et al*., 2010) แมลงในกลุ่มนี้จัดอยู่ในวงศ์ Psyllidae อันดับ Homoptera (Sdoodee and Garnett, 1994) เชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงยังสามารถถ่ายทอดได้โดยฝอยทอง (dodder) และวิธีการขยายพันธุ์พืชโดยการติดตา หรือ การทาบกิ่ง (Lin *et al*., 2010) แต่ไม่ติดไปกับเมล็ด (ไมตรี พรหมมินทร์, 2548) มีรายงานว่าวิธีการเสียบข้าง โดยการใช้กิ่งที่แสดงอาการของโรคฮวงลองบิง สามารถถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงได้ โดยจะแสดงอาการของโรคภายใน 3-9 เดือน (Shokrollah *et al*., 2011)

ลักษณะอาการของโรคฮวงลองบิงเริ่มแรกจะสังเกตเห็นอาการยอดเหลืองเกิดเฉพาะบางส่วนของต้น ขณะที่ส่วนอื่นของต้นไม่มีอาการ การกระจายของเชื้อในต้นเดียวกันไม่สม่ำเสมอ และเมื่อเชื้อเคลื่อนที่ผ่านระบบท่อลำเลียงของพืช เข้าไปอยู่ในท่ออาหารอาการจะเกิดเด่นชัดขึ้น โดยทั้งต้นจะกลายเป็นสีเหลือง ต่อมาก็จะเกิดการเน่าตายของเนื้อเยื่อกิ่งหรือแห้งตาย อาการสำคัญที่เกิดขึ้นบริเวณใบ คือ อาการด่างเป็นจ้ำๆ ลักษณะสีเขียวเข้มหรือเขียวอ่อนเป็นหย่อมๆ เมื่อใบติดเชื้อรุนแรงพื้นที่สีเขียวจะเหลือเป็นจุดเล็กลงจนพื้นใบกลายเป็นสีเหลืองอ่อนหรือเขียวอ่อนเป็นอาการที่รู้จัก “green islands” และอาการของกิ่งที่ติดเชื้อรุนแรงจะทำให้ใบร่วง ยอดที่แตกใหม่ใบลีบเล็กไม่พัฒนา สีเหลือง ลักษณะเรียวแหลมตั้งชี้ขึ้นคล้ายหูกระต่าย (rabbit ears) จะแสดงอาการเด่นชัดในส้ม Sweet orange (*C. sinensis*), ส้มโอ (*C. maxima*) และส้มแมนดาริน (*C. reticulata*) อาการที่เกิดขึ้นกับผลจะทำให้ผลมีขนาดเล็กและผิดรูปร่างอาจร่วงก่อนกำหนด และเมื่อผ่าผลดูในลักษณะแนวตั้งพบว่าแกนผลจะโค้งงอ เมล็ดลีบ ซึ่งอาการเหล่านี้จะพบในผลส้มโอ และส้ม Sour orange (*C. aurantium*) (Gemez, 2008) ผลส้มที่แก่จะไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองตามปกติจะมีสีเขียวเหลืออยู่ ต้นส้มโทรม กิ่งแห้งตายจากปลายยอดลุกลามไปทั่วทั้งต้น (ไมตรี พรหมมินทร์, 2548)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา

เทคนิคอิไลซา (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) เป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่อาศัยการติดฉลากแอนติบอดี้ด้วยเอนไซม์ ซึ่งนำมาใช้ตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส ซึ่งเป็นวิธีการที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความไวสูง ใช้ระยะเวลาไม่นาน (รัตนา สดุดี, 2537) Bar-Joseph และคณะ (1979) นำเทคนิค ELISA มาใช้จำแนกเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสของส้มในประเทศอิสราเอล 5 ไอโซเลท และไอโซเลทจากรัฐฟลอริด้าที่แสดงอาการโทรมไม่รุนแรง (mild quick decline) อาการต้นกล้าเหลืองและแสดงลักษณะอาการไม่แน่นอน จากต้นในแปลงปลูก โดยตรวจหาเชื้อไวรัสในน้ำคั้นจากเนื้อเยื่อของเส้น

กลางใบและน้ำคั้นจากเนื้อเยื่อเปลือก ผลการทดลองพบว่าค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ 405 นาโนเมตร จากเนื้อเยื่อเปลือกสูงกว่าค่าอ่านจากเนื้อเยื่อของเส้นกลางใบ แสดงว่ามีการปรากฏของเชื้อในเนื้อเยื่อเปลือกสูงกว่าในเส้นกลางใบ รัตนา สดุดี (2537) นำเทคนิค double antibody sandwich ELISA มาใช้ตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสจากเส้นกลางใบของส้มจุกที่เป็นโรคโทรม โดยใช้ polyclonal antibody ผลการตรวจพบว่าตัวอย่างส้มจุกเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส 25 ตัวอย่างจาก 28 ตัวอย่าง รัตนา สดุดี และคณะ (2551) นำเทคนิค plate trapped ELISA มาใช้ตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสจากเส้นกลางใบหรือเปลือกเขียวของส้ม ผลการตรวจพบว่าตัวอย่างส้มจากทางภาคเหนือ และภาคใต้ ของประเทศไทย ติดเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส 25 ตัวอย่างจาก 28 ตัวอย่าง และ 63 ตัวอย่างจาก 74 ตัวอย่าง ตามลำดับ

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (polymerase chain reaction: PCR) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ตรวจดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง ในหลายๆ ประเทศรวมทั้งประเทศไทย มีข้อดี คือ ให้ผลถูกต้องแม่นยำสูง (Sdoodee *et al*., 1999) และยังเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับในการวินิจฉัยโรคในปัจจุบัน (Gemez, 2008) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะกับดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อฮวงลองบิง *Candidatus* Liberibacter *asiaticus*

Primer set	Primer sequence (5′–3′) (forward/reverse)	DNA เป้าหมาย	ขนาดผลผลิต PCR (bp)	อ้างอิง
OI1 /OI2	GCG CGT ATG CAA TAC GAG CGG CA/ GCC TCG CGA CTT CGC AAC CCA T	16S rDNA	1,160	Jagoueix และคณะ (1994)
A2/J5	TAT AAA GGT TGA CCT TTC GAG TTT/ ACA AAA GCA GAA ATA GCA CGA ACA A	*rpl*A/J	703	ลัดดาวัลย์ สมเพาะ และคณะ (2550); ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล (2552)
Omp1218f/ Omp2026r	TAT CAT GGC CAC GGG TTA TT/ CAC GCG GAC CTA TAC CCT TA	*omp*	809	Deng และคณะ (2008)

ไพรเมอร์ OI1และ OI2c นำไปใช้ในการตรวจหาเชื้อฮวงลองบิงในพืชตระกูลส้มทั้งในและต่างประเทศ (Jagoueix *et al*., 1996; Sdoodee *et al*., 1999; Teixeira *et al*., 2005)

ลัดดาวัลย์ สมเพาะ และคณะ (2550) นำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจวินิจฉัยโรคฮวงลองบิงที่เกิดจากเชื้อ *Ca*. L. *asiaticus* ในมะนาว โดยใช้ไพรเมอร์ A2 และ J5 ที่จำเพาะกับการยีน *rplJ* ให้ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอขนาด 703 bp ผลปรากฏว่าสามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง 285 ตัวอย่างจาก 471 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 60.51

อารมณ์ จันทะสอน และคณะ (2550) ใช้เทคนิค PCR วินิจฉัยโรคฮวงลองบิงในพืชตระกูลส้มของประเทศไทย ที่เกิดจากเชื้อ *Ca*. L. *asiaticus* โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่จำเพาะกับการยีน *rplJ* ผลปรากฏว่าสามารถใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงทั้ง 68 ตัวอย่างจาก 68 ตัวอย่าง จากส้ม 5 ชนิด

ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล (2552) นำเทคนิค PCR มาใช้ตรวจเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง *Ca*. L. *asiaticus* ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออกในอำเภอเวียงแก่นจังหวัดเชียงราย โดย ใช้ไพรเมอร์ A2 และ J5 ที่จำเพาะกับการยีน *rpl*KAJL-*rpro*BC operon ให้ผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอขนาด 703 bp สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงประมาณร้อยละ 5-10 ของจำนวนต้นทั้งหมดในแต่ละสวนที่ทำการสุ่มตรวจจำนวน 40 ตัวอย่าง จากสวนเกษตรกรจำนวน 5 สวน

การจัดการโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิง

เชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาและโรคฮวงลองบิงสามารถแพร่กระจายไปยังส้มปกติโดยการติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ เช่น การติดตา ตอนกิ่ง เสียบยอด และเชื้อทั้งสองชนิดมีแมลงพาหะในการถ่ายทอด การป้องกันและควบคุมเชื้อทั้งสองไม่ให้ทำความเสียหายต่อการผลิตส้ม ต้องเริ่มจากใช้กิ่งพันธุ์ที่ปลอดจากเชื้อทั้งสอง เพื่อป้องกันไม่ให้มีเชื้อสาเหตุโรคในต้นส้มที่จะเจริญเติบโตต่อไป เนื่องจากพบว่าหากส้มติดเชื้อขณะที่อายุยังน้อยจะส่งผลรุนแรงกว่าส้มที่เจริญเต็มที่แล้ว จึงต้องมีการควบคุมและป้องกันไม่ให้แมลงนำเชื้อสาเหตุโรคเข้าสู่แปลงปลูก กำจัดส้มที่เป็นโรค และการใช้กิ่งพันธุ์ปลอดโรคปลูกในแปลงเพื่อหลีกเลี่ยงการนำเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดเข้าสู่แปลงปลูก (รัตนา สดุดี, 2537)

ผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอปลอดโรค

สุดาวรรณ มีเจริญ และคณะ (2550) รายงานว่าการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอปลอดโรคเป็นการผลิตกิ่งพันธุ์ที่ปลอดจากเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส และแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิง ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อของต้นหรือกิ่งพันธุ์ เมื่อนำต้นพันธุ์ส้มโอปลอดโรคไปปลูกและมีการดูแลรักษาที่ถูกต้องจะทำให้ต้นส้มโอมีอายุยืนยาวและให้ผลผลิตสูงกว่ากิ่งพันธุ์ที่ได้จากวิธีการตอนกิ่ง โดยศูนย์วิจัยพืชสวนจังหวัดพิจิตร กรมวิชาการเกษตร ได้จัดทำโครงการผลิตกิ่งพันธุ์ต้นส้มโอปลอดโรค ระหว่างปี 2543-2550 จำนวน 19,000 ต้น ใช้ตาพันธุ์ดีปลอดโรคจากต้นแม่พันธุ์ 4 ชนิด คือส้มโอพันธุ์ทองดี ขาวน้ำผึ้ง ขาวแตงกวา และท่าข่อย ติดลงบนต้นตอส้มทรอยเยอร์ และต้นตอส้มพันธุ์โวลคาเมอริน่า ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ต้านทานโรครากเน่าโคนเน่า สามารถเชื่อมกับยอดพันธุ์ได้ดี ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตดี กิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้มีอัตราการรอดของตาสูงถึง 70% นอกจากนี้มีรายงานว่าศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรขอนแก่น ได้ทำการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอปลอดโรคด้วยวิธีการติดตา ปีละประมาณ 1 พันกิ่ง โดยใช้ส้มพันธุ์โวลคาเมอริน่าเป็นต้นตอ ติดตาด้วยส้มโอพันธุ์ดี เช่น ส้มโอพันธุ์ทองดี และพันธุ์ขาวน้ำผึ้ง โดยต้นแม่พันธุ์จะปลูกไว้ในโรงเรือนตาข่าย เพื่อป้องกันโรคและแมลงทำลาย (สารคดีเกษตร, 2010)

Abbas และคณะ (2006) ขยายพันธุ์ส้ม Sweet orange ให้ปราศจากเชื้อซิตรัส-ทริสเตซาไวรัส โดยใช้วิธีการติดตาไมโคร budding โดยใช้ตาของส้มติดเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส และส้มปกติ Sahiwal และ Fasisalabad ตามลำดับ ใช้ตาขยายพันธุ์ที่มีขนาด 3 มิลลิเมตร และ 4 มิลลิเมตร ติดลงบนต้นตอส้ม Rough lemon อายุ 4-6 เดือน ที่ระดับความสูง 15 เซนติเมตร และ 23 เซนติเมตร ผลปรากฏว่าการใช้ตาขยายพันธุ์ขนาด 4 มิลลิเมตร ที่ระดับความสูง 23 เซนติเมตร มีประสิทธิภาพสูงที่สุดโดยมีอัตรารอด 50% ในการขยายพันธุ์ส้ม Sweet orange

Sdoodee และคณะ (2008) ผลิตกิ่งพันธุ์ส้มจุกปลอดเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส และเชื้อกรีนนิ่งโดยวิธีการติดตา จากการใช้ต้นแม่พันธุ์ส้มจุกที่ได้จากการปักชำ ผ่านการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส และเชื้อกรีนนิ่งแล้วไม่พบ และได้นำมาเพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนตาข่ายกันแมลง ผลปรากฏว่ากิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้มีอัตรารอดสูงถึง 80%

การขยายพันธุ์พืชโดยวิธีการตอนกิ่ง และวิธีการติดตา

การตอนกิ่ง (marcotting หรือ air-layering)

เป็นการขายพันธุ์พืช โดยการใช้ส่วนของลำต้น ซึ่งสามารถเกิดราก และเจริญเป็นพืชต้นใหม่ได้ขณะที่ยังอยู่บนต้นแม่ ซึ่งต้นใหม่จะมีอาหารจากต้นแม่มาเลี้ยงในช่วงที่รอให้เกิดราก นิยมทำการตอนในช่วงฤดูฝน เพราะไม่ต้องดูแลเรื่องความชื้น กิ่งพันธุ์ที่ดีควรมีลักษณะที่แข็งแรงตรงตามพันธุ์ และปราศจากโรค โดยจะทำการตอนกิ่งต้องมีลำต้นตั้งตรง มีจำนวนใบที่เสมอกัน (ประดับ กลัดเข็มเพชร, 2552) เพราะกิ่งที่ตั้งตรงจะออกรากง่ายกว่ากิ่งที่อยู่ในแนวนอน กิ่งตอนที่เลือกต้องมีความสมบูรณ์แข็งแรงไม่มีอาการของโรคและแมลง กิ่งไม่อ่อนหรือแก่เกินไป ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของกิ่งตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตร มีความยาวประมาณ 50 เซนติเมตร ไม่มีดอก และไม่มีผล (สรรเสริญ วันจันทร์, 2555) วิธีการเริ่มจากควั่นเปลือกออกจากกิ่งและขูดเอาเนื้อเยื่อระหว่างเปลือกกับเนื้อไม้ออก นำขุยมะพร้าวทำให้ชื้นไปหุ้มรอบๆ แผล และใช้พลาสติกหุ้มเพื่อไม่ให้แห้ง รากจะออกมาจากส่วนเหนือของแผลหลังจาก 2-6 เดือน ขึ้นอยู่กับชนิดของของพืช ซึ่งเมื่อรากงอกแล้วสามารถตัดกิ่งตอนได้ แต่จะไม่ตัดกิ่งตอนเมื่อมียอดอ่อน (ภาพที่ 1) (Verheij, 2004) นิยมตอนกิ่งในไม้ผล เช่น ฝรั่ง ลิ้นจี่ ส้มต่างๆ และมะนาว ในพืชตระกูลส้มจะตัดกิ่งตอนลงปลูกในกระถางหรือถุงเพาะชำหลังจากตอนกิ่งประมาณ 35-40 วัน หรือมีรากมากพอ ซึ่งรากจะต้องเป็นสีเหลืองแก่หรือสีน้ำตาล และจะต้องตัดแต่งกิ่ง และใบ เพื่อลดการคายน้ำ การตอนกิ่งมีข้อดี คือ เพิ่มจำนวนต้นพืชได้เร็ว ทรงพุ่มขนาดกลาง ไม่กลายพันธุ์ ให้ผลเร็ว ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว และต้นทุนต่ำ แต่ก็มีข้อเสีย คือ ไม่มีระบบรากแก้ว โค่นล้มง่าย อายุไม่ยืน (สรรเสริญ วันจันทร์, 2555)

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการตอนกิ่งพืชโดยทั่วไป

ที่มา: Verheij (2004)

การติดตา

การติดตาเป็นการนำเอาแผ่นตาจากกิ่งพันธุ์ดีที่ปราศจากโรคและแมลง มีลักษณะตรงตามพันธุ์ ไปติดบนต้นตอเพื่อให้ได้พืชพันธุ์ดีตามที่ต้องการ (สรรเสริญ วันจันทร์, 2555) เป็นการเชื่อมประสานส่วนของต้นพืชเข้าด้วยกัน ให้เจริญเป็นต้นเดียวกัน ซึ่งต้นตอมาจากการเพาะเมล็ดมีระบบรากแก้วที่แข็งแรง ทำหน้าที่หาอาหารและยึดลำต้น ต้นตั้งตรง ต้านทานโรคราก และโคนเน่า อายุประมาณ 4-12 เดือน เส้นผ่าศูนย์กลางของลำต้นประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร การติดตาจะมีวิธีการทำ 2 วิธี คือ วิธีการติดตาแบบลอกเนื้อไม้และไม่ลอกเนื้อไม้ (ประดับ กลัดเข็มเพชร, 2552) ซึ่งมีข้อดี คือ ประหยัดการใช้กิ่งพันธุ์ ไม่กลายพันธุ์ พืชมีรากแก้ว ไม่ล้มง่าย ทรงพุ่มเตี้ยให้ผลเร็ว ในการติดตาถ้าแผ่นตายังเขียวอยู่แสดงว่าการติดตาประสบความสำเร็จใช้มีดกรีดพลาสติกด้านหลังแผ่นตาออก เพื่อให้ตาเจริญเติบโต แต่ถ้าแผ่นตาเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลแสดงว่าการติดตาเสีย (สรรเสริญ วันจันทร์, 2555) การที่จะประสบความสำเร็จในการติดตา ต้องมีการพัฒนาของระบบลำเลียง และมีการเชื่อมต่อกันระหว่างเนื้อเยื่อตาและต้นตออย่างสมบูรณ์และปล่อยให้ระบบท่อลำเลียงของรากเป็นตัวส่งน้ำและอาหารไปยังตา จากนั้นก็จะมีการเจริญของยอด ที่จะไปส่งเสริมการสังเคราะห์แสงไปยังต้นตอ (Bar-Joseph *et al*., 2011) การใช้ตาและต้นตอต้องที่มีความเหมาะสมกัน ขณะที่ติดตาอากาศจะต้องไม่ร้อนจัด ไม่เปียกชื้น วัสดุและอุปกรณ์จะต้องสะอาด ระวังไม่ให้สิ่งสกปรกเข้าบริเวณแผล พันพลาสติกให้แน่นเพื่อไม่ให้น้ำเข้า แผ่นตาไม่ช้ำหรือน้ำเลี้ยงแห้ง ต้นตอและตาที่ใช้จะต้องสมบูรณ์ที่สุด (สรรเสริญ วันจันทร์, 2555) ในการติดตาส้มโอมีรายงานว่า สุดาวรรณ มีเจริญ และคณะ (2550) ใช้เทคนิคการติดตาเพื่อผลิตส้มโอปลอดโรคโดยใช้ตาพันธุ์ดีจากต้นแม่พันธุ์ส้มโอปลอดโรคที่เลี้ยงในโรงเรือนกันแมลง โดยเลือกกิ่งที่มีลักษณะค่อนข้างกลม สีเขียว มีความสมบูรณ์ไม่มีโรคและแมลง ติดตาบนต้นตออายุ 6-8 เดือน เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 เซนติเมตร (ขนาดแท่งดินสอดำ) ที่ระดับความสูง 30 เซนติเมตร หลังจากติดตา 3 สัปดาห์ ตัดยอดต้นตอเหนือรอยติดตาสูง 5-10 เซนติเมตร เพื่อชักนำการเกิดตา จากนั้นดูแลให้ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 5 เม็ดทุกๆ 15 วัน รดน้ำวันละครั้ง พบว่ากิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้มีอัตรารอด 70%

3. **วัตถุประสงค์**

1. เพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์ปลอดโรคของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจากต้นส้มโอในแปลงปลูกโดยวิธีการตอนกิ่ง
2. เพื่อผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค (nursery tree) ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยใช้ตาจากต้นแม่ที่เป็นกิ่งตอน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุปลูก

- กระถางพลาสติกสีดำขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร
- ดินผสม
- ปุ๋ยคอก
- ปุ๋ยออสโมโค้ทสูตร 15-15-15

1.2 สารเคมี

- Ethanol absolute
- Isoamyl alcohol
- Isopropanol
- Chloroform
- Ethidium bromide
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Grinding buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
    - K_2HPO_4-$3H_2O$
    - KH_2PO_4
    - Sucrose
    - Polyvinylpyrrolidone (PVP-10)
    - Ascorbic acid
    - Bovine serum albumin
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม CTAB buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
    - NaCl
    - Tris base
    - EDTA

- Polyvinylpyrrolidone Mr 40,000
- Mercaptoethanol

- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม TBE buffer pH 8.0 (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - Tris-HCl
  - Boric acid
  - EDTA
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Loading dye (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - glyceral
  - EDTA
  - Bromophenal
  - Xylene cyanol
- สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reagent mixture)
  - Sterile deionized water
  - Taq polymerase buffer
  - $MgCl_2$
  - dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
  - Primer (C9-C10)
  - Taq polymerase
  - Mineral oil
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Agarose gel (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - Agarose (DNA grade)
  - 0.5 เท่า TBE buffer
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Coating buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - Na_2CO_3
  - $NaHCO_3$

- NaN_3

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Phosphate buffer saline (PBS) (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - NaCl
  - KH_2PO_4
  - $Na_2H_2PO_4 12H_2O$
  - KCl
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Washing buffer (PBS-T) (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - PBS
  - Tween 20
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Conjugate buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - PBS-T
  - Polyvinylpyrrolidone Mr 40,000
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Substrate buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - Diethanalamine
  - NaN_3
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Reaction stopping solution (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
  - NaOH

1.3 พืชที่ใช้ในการทดลอง

1.3.1 ต้นตอส้มโอ (rootstock)

เตรียมต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม และต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดีเพื่อใช้ในการผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค โดยเพาะเมล็ดส้มโอทั้งสองพันธุ์ในกะบะทรายแล้วเพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนตาข่ายกันแมลง เมื่อต้นกล้ามีอายุ 1 เดือน ย้ายปลูกในถุงพลาสติกขนาด 12x16 เซนติเมตร บรรจุดินผสมปริมาตร 1 ลิตร และเลี้ยงดูต้นตอในโรงเรือนตาข่ายกันแมลง เมื่อต้นตอมีอายุ 6 เดือนขึ้นไป (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3) จึงนำมาใช้ในงานทดลองต่อไป

1.3.2 แหล่งของตา (budwood)

ในการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอปลอดโรค ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามซึ่งผลิตจากกิ่งตอน ซึ่งตอนมาจากต้นส้มโอในแปลงปลูกของสวนส้มจำนวน 2 สวน คือสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ของนายวิรัช สุขแสง (รหัสต้น DAT) และสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ของนางสมพร ณ นคร (รหัสต้น SPT) หมู่บ้านแสงวิมาน ต.คลองน้อย อ.ปากพนัง จ. นครศรีธรรมราช

(ก)

(ข)

ภาพที่ 2 ต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดีที่ใช้ในการผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค

(ก) ต้นส้มโอพันธุ์ทองดีอายุ 1 เดือน ก่อนย้ายปลูกในถุงพลาสติกสีดำ

(ข) ต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดีอายุ 6 เดือน

(ก)

(ข)

ภาพที่ 3 ต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่ใช้ในการผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค

(ก) ต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามอายุ 1 เดือน ก่อนย้ายปลูกในถุงพลาสติกสีดำ

(ข) ต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามอายุ 7 เดือน

1.4 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

- ไมโครปิเปตต์ ขนาด 2, 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- ปิเปตต์ทิป ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- Pasteur pipette
- Graduate pipette
- หลอดพลาสติกขนาด 0.5, 1.5 และ 2.0 มิลลิลิตร
- หลอดสำหรับพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 500 ไมโครลิตร
- โกร่งบดตัวอย่างพืช
- เครื่องแก้วสำหรับเตรียมสารเคมี
- หม้อนึ่งความดัน
- ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave)
- ตู้แช่แข็ง – 20 องศาเซลเซียส
- เครื่อง PCR thermal cycler
- เครื่อง Electrophoresis
- เครื่อง Gel document
- เครื่อง ELISA Reader
- เครื่อง incubator
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่องต้มน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (microfuge)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (MSE coolspin 2)

1.5 อุปกรณ์นอกห้องปฏิบัติการ

- โรงเรือนตาข่ายกันแมลง

2. เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

2.1 เทคนิคการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสโดย Plate Trapped ELISA

การตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค ELISA จากใบส้มโอโดยวิธีการดัดแปลงมาจาก Roistacher (1991) นำตัวอย่างใบส้มมาทำความสะอาดตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบหั่นเป็นชิ้นบดเส้นกลางใบใน coating buffer อัตราส่วน 1:10 (เนื้อเยื่อ: บัฟเฟอร์) ด้วยครกบดซึ่งผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำของเหลวที่ได้จากการบดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่ในไมโครเพลตหลุมละ 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 หลุม จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เทของเหลวทิ้ง ล้างด้วย PBS-T 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที ใส่ BSA 2% (blocking solution) หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาล้างเหมือนขั้นตอนแรก จากนั้นใส่ CTV-antiserum (IgG) เข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร นำไปบ่ม และล้างเหมือนขั้นตอนแรก ขั้นต่อไปใส่ GAR-AP (goat antirabbit-alkaline phosphatase conjugate) เข้มข้น 1:4000 ลงในไมโครเพลต หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มและล้างเหมือนขั้นตอนที่ผ่านมา จากนั้นเติม substrate (p-nitrophenyl phosphate) ที่ละลายใน substrate buffer อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อบับเฟอร์ 1 มิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย 3 M NaOH (stopping reaction solution) นำผลไปอ่านค่าของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ELISA reader รุ่น Power Wave$_x$ ที่ผลิตโดยบริษัท Bio-Tek โดยใช้คลื่นแสง 405 นาโนเมตร

2.2 เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Ca.* L. *asiaticus* จากตัวอย่างส้มโอ

สกัดดีเอ็นเอจากเส้นกลางใบของส้มโอตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Dellaporta และคณะ (1983) โดยนำตัวอย่างพืชมาตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ จากนั้นหั่นให้เป็นชิ้นขนาดเล็กใส่ตัวอย่างเส้นกลางใบหนัก 1-2 กรัม ลงในครกบดที่แช่เย็น เติมสารละลาย grinding buffer ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แช่ไว้ในน้ำแข็งนาน 20 นาที บดตัวอย่างให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย grinding buffer ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีก 6 มิลลิลิตร บดตัวอย่างซ้ำอีกครั้ง ดูดน้ำคั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 7 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสตอนบนใส่หลอดใหม่นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 45 นาที เทของเหลวทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วย CTAB buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วบรรจุใส่หลอด

ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 นาทีเขย่าเป็นระยะๆ จากนั้นเติม chloroform/isoamyl อัตรา 1:1 เท่าของสารที่มีอยู่ เขย่าให้เข้ากัน 3 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ของเหลวจะแยกเป็น 2 ชั้น ดูดของเหลวส่วนบนมาใส่หลอดขนาด 2 มิลลิลิตรจากนั้นเติม isopropanol ในอัตรา 1:1 ของของเหลวที่ดูดได้ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทเอาของเหลวทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง โดยนำไป centrifuge ครั้งละ 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้งโดยใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนด้วย sterile deionized water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 ตรวจเชื้อ *Ca.* L. *asiaticus* โดยการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค PCR

ทำการผสม PCR reagent ซึ่งประกอบด้วย Taq polymerase bufferเข้มข้น 10 เท่า, $MgCl_2$ 50 mM, dNTP mixture 10 mM และ primers 0.5 µM (forward primer 5’ GCGCG TATGCAATACGAGCGGCA 3’ และ reverse primer 5’ GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT 3’) ตามวิธีการที่รายงานโดย (Jagoueix *et al*., 1994) ไพรเมอร์ที่ใช้มีความจำเพาะต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (16S rRNA gene) ของเชื้อ *Ca.* L. *asiaticus* ที่มีขนาด 1,160 bp Taq polymerase ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรกับดีเอ็นเอซึ่งสกัดได้จากส้มโอ 2 ไมโครลิตรรวมทั้งสิ้น 50 ไมโครลิตรลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปิดทับด้วยน้ำมัน (mineral oil) 10 ไมโครลิตร นำส่วนผสมเข้าเครื่อง PCR thermal cycler โดยมีอุณหภูมิเริ่มต้น (Hot start) 94 องศาเซลเซียส 5 นาที เพื่อแยกสายดีเอ็นเอก่อนเริ่มต้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยอุณหภูมิรอบ 35 รอบ ซึ่งมีอุณหภูมิดังนี้

1-34 cycle	94°C	1	นาที	
	55°C	30	วินาที	
	72°C	1	นาที	30 วินาที
35 cycle	94°C	1	นาที	
	55°C	30	วินาที	
	72°C	10	นาที	

2.4 ตรวจผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อ *Ca.* L. *asiaticus* จากปฏิกิริยา PCR โดยเทคนิค Electrophoresis

ทำการตรวจหาผลผลิตดีเอ็นเอของเชื้อ *Ca.* L. *asiaticus* ซึ่งได้จากปฏิกิริยา PCR ในอากาโรสเจลเข้มข้น 1.5% โดยใช้ agarose 1.5 กรัม ละลายใน TBE buffer เข้มข้น 0.5 เท่า ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอมละลายด้วยความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟนาน 2 นาที โดยใช้ความร้อนในระดับปานกลาง จากนั้นเติม ethidium bromide ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ 5 นาที เทเจลลงในเบ้าพิมพ์ที่เตรียมไว้นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว นำเจลใส่ในเครื่อง Electrophoresis เติม TBE buffer เข้มข้น 0.5 เท่า ปริมาตร 700 มิลลิลิตร หลังจากผสม loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเข้ากับผลผลิตดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรลงใน microtube แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงนาน 5 วินาที จากนั้นนำไปหยดในช่องเจลตามลำดับ เปิดความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นตรวจผลผลิตดีเอ็นเอและถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel documentation โดยใช้ความยาวคลื่นแสง 300 นาโนเมตร

3. วิธีการดำเนินการ

3.1 การผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอทับทิมสยามโดยใช้กิ่งตอน

3.1.1 คัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูก

คัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม จากสวนของเกษตรกรในเขตลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 2 สวน คือ สวนที่มีอายุต้น 4 ปี และสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ในแต่ละสวนจะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มๆ ที่ 1 เลือกต้นส้มโอจำนวน 20 ต้น ตรวจโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิค ELISA และ PCR ตามลำดับ ต้นที่ตรวจไม่พบคัดเลือกมาใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์จำนวน 10 ต้น กลุ่มที่ 2 ไม่มีการตรวจโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิง คัดเลือกโดยดูลักษณะความสมบูรณ์ แข็งแรง มีคุณสมบัติตรงตามสายพันธุ์จำนวน 10 ต้น

3.1.2 ผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอจากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง

ทำการทดลองโดยการตอนกิ่งส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่มีอายุกิ่งประมาณ 6-12 เดือน มีเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 2 เซนติเมตร จากต้นแปลงในแปลงปลูกของสวนที่มีอายุต้นส้ม 4 ปี และ 8 ปี ที่คัดเลือกไว้ทั้งสองกลุ่ม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ factorial design ซึ่งมีสองปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 คือ อายุของส้มโอมี 2 ระดับคือ

A1 = ต้นส้มโอจากสวนอายุ 4 ปี

A2 = ต้นส้มโอจากสวนอายุ 8 ปี

ปัจจัยที่ 2 คือ การตรวจโรคมี 2 ระดับคือ

B1 = ผ่านการตรวจโรค และไม่ติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา และเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

B2 = ไม่มีการตรวจโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิง

โดยมีหน่วยการทดลองดังนี้

A1B1 ต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A1B2 ต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจโรค

A2B1 ต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A2B2 ต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 8 ปี ไม่มีการตรวจโรค

ใช้ต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูก 10 ต้น ต่อหน่วยการทดลอง และตอนกิ่ง 10 กิ่งต่อต้น เมื่อกิ่งตอนมีการเจริญของรากเต็มที่ ตัดกิ่งตอนมาปลูกในกระถางพลาสติกสีดำขนาด 15 นิ้ว ซึ่งบรรจุดินผสม (ดิน 1 ส่วน ทราย 2 ส่วน และปุ๋ยคอก 1 ส่วน) ปริมาตร 7 ลิตร ปลูกเลี้ยงกิ่งตอนในเรือนตาข่ายกันแมลง จากนั้นประเมินผลการรอดชีวิต และตรวจหาเชื้อในกิ่งตอนซ้ำอีกครั้งเมื่อกิ่งตอนมีอายุ 6 เดือน ด้วยเทคนิค PCR และ ELISA ตามวิธีการของ Sdoodee และคณะ (2008) ประเมินจำนวนต้นส้มโอปลอดโรคที่ได้จากแต่ละแบบการทดลอง ต้นแม่พันธุ์ส้มโอที่เจริญจากกิ่งตอนในแต่ละสิ่งทดลองจะใช้เป็นงานทดลองการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอปลอดโรคต่อไป เปรียบเทียบกันโดยใช้แบบแผนการทดลองข้างต้น

3.2 ผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

3.2.1 การผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรค

นำตาขยายพันธุ์จากต้นแม่พันธุ์ (กิ่งตอน) ที่มาจากการทดลองในข้อ 3.1.2 คือ ต้นในแปลงปลูกที่มีอายุต้น 4 ปี และ 8 ปี ในกลุ่มที่มีการตรวจ และไม่มีการตรวจโรค เลี้ยงดูในเรือนตาข่ายกันแมลง ซึ่งจะใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์กลุ่มๆ ละ 5 ต้น โดยต้นแม่พันธุ์ 1 ต้น จะใช้ 10 ตา ติดบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม 5 ตา และติดบนต้นตอส้มโอทองดี 5 ตา (1 ตาต่อต้นตอ) ใช้ต้นตออายุ 6-7 เดือน โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ factorial design ซึ่งมีสามปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ อายุต้นมี 2 ระดับ คือ

A1 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ผลิตจากสวนที่มีอายุต้น 4 ปี

A2 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ผลิตจากสวนที่มีอายุต้น 8 ปี

ปัจจัยที่ 2 คือ การตรวจเชื้อมี 2 ระดับ คือ

B1 = ต้นแม่พันธุ์กลุ่มที่ตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกผ่านการตรวจเชื้อ

B2 = ต้นแม่พันธุ์กลุ่มที่ตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกไม่มีการตรวจเชื้อ

ปัจจัยที่ 3 คือ ชนิดของต้นตอมี 2 ระดับ คือ

C1 = ต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดี

C2 = ต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

โดยมีหน่วยการทดลองดังนี้

A1B1C1 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A1B2C1 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A1B1C2 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

A1B2C2 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

A2B1C1 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A2B2C1 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่มีการตรวจโรคติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A2B1C2 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจโรคติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

A2B2C2 ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่มีการตรวจโรคติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

ทำการตรวจนับอัตราการรอดของการติดตา และตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาและเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงในกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้เมื่อมีอายุ 3 เดือน โดยเทคนิค ELISA และ PCR เปรียบเทียบกันโดยใช้แบบแผนการทดลองข้างต้น

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยใช้กิ่งตอน

1.1 คัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูก

ผลการคัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจากแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี จำนวน 20 ต้น ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาจำนวน 7 ต้นจาก 20 ต้น (ตารางที่ 2 และ 3) โดยตัวอย่างที่ติดเชื้อมีค่าปฏิกิริยา ELISA อยู่ระหว่าง ($\bar{x}$ ± SD = 0.222 ± 0.042 - 0.600 ± 0.025) และพบส้มโอจำนวน 2 ต้น จาก 20 ต้น ที่มีปฏิกิริยา ELISA ต่ำ ผลการตรวจเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงในส้มโอโดยเทคนิค PCR พบเชื้อสาเหตุโรค 1 ต้น จาก 20 ต้น (ภาพที่ 4 และ 5) ในกลุ่มที่ 1 คัดเลือกต้นส้มโอที่ตรวจไม่พบเชื้อทั้งสองชนิดจำนวน 10 ต้น ซึ่งได้แก่ DAT1-3, DAT1-5, DAT5-1, DAT6-5, DAT8-2, DAT9-2, DAT9-3, DAT9-5, DAT10-4, และได้คัดเลือกต้น DAT4-1 ซึ่งมีปฏิกิริยาต่ำ (ภาพที่ 10ก) กลุ่มที่ 2 ไม่มีการตรวจโรคจำนวน 10 ต้น ได้แก่ DAT1-1, DAT2-2, DAT2-4, DAT3-3, DAT3-5, DAT4-3, DAT5-2, DAT6-1, DAT8-4, และ DAT10-5 เพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอจากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง

ผลการคัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจากแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี จำนวน 20 ต้น ตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา 5 ต้น จาก 20 ต้น (ตารางที่ 4) คิดเป็น 25% ของตัวอย่างทั้งหมด โดยตัวอย่างที่ติดเชื้อมีค่าปฏิกิริยา ELISA อยู่ระหว่าง ($\bar{x}$ ± SD = 0.273 ± 0.004 - 1.447 ± 0.046) และผลการตรวจเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงในส้มโอโดยเทคนิค PCR ไม่พบเชื้อสาเหตุโรคทั้ง 20 ต้น (ภาพที่ 6, 7, 8 และ 9) คัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามที่ตรวจไม่พบเชื้อจำนวน 10 ต้นในกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้แก่ SPT1-3, SPT2-3, SPT3-3, SPT4-5, SPT6-3, SPT7-3, SPT10-2, SPT12-4, SPT12-5 และ SPT14-4 (ภาพที่ 10ข) กลุ่มที่ 2 ไม่มีการตรวจเชื้อ จำนวน 10 ต้น ได้แก่ SPT2-2, SPT3-4, SPT5-3, SPT5-5, SPT6-4, SPT8-3, SPT8-5, SPT9-2, SPT9-4 และ SPT13-5 เพื่อผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอจากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 1-15

ลำดับต้นในแปลงปลูก[1/]	ELISA
	OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)[2/]
DAT1-4	0.600 ± 0.025
DAT1-5	0.137 ± 0.025
DAT2-3	0.157 ± 0.059
DAT3-1	0.222 ± 0.042
DAT4-1	0.187 ± 0.066
DAT4-2	0.206 ± 0.008
DAT4-5	0.393 ± 0.020
DAT5-3	0.252 ± 0.030
DAT6-5	0.132 ± 0.035
DAT8-1	0.331 ± 0.033
DAT8-2	0.099 ± 0.016
DAT8-3	0.257 ± 0.021
DAT9-2	0.080 ± 0.006
DAT9-5	0.136 ± 0.022
DAT10-4	0.155 ± 0.124

[1/] DAT = ต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี, ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้น, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถว

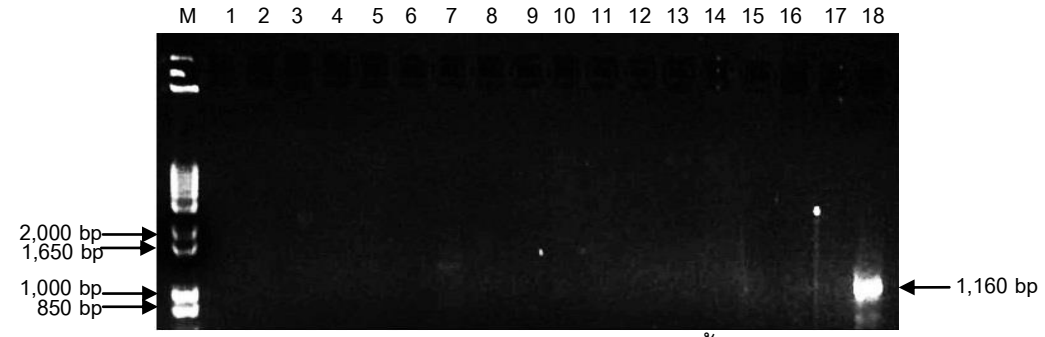
[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA จากมะนาวปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.038 ± 0.000) เมื่อค่าปฏิกิริยาสูงกว่า 0.169 ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส) ตามวิธีการของ Bioreba (2011) ดังภาพภาคผนวก ค. ที่ 1

ตารางที่ 3 ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 16-20

ลำดับต้นในแปลงปลูก[1/]	ELISA
	OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)[2/]
DAT1-3	0.130 ± 0.023
DAT3-4	0.169 ± 0.025
DAT5-1	0.165 ± 0.016
DAT7-1	0.283 ± 0.005
DAT9-3	0.108 ± 0.000

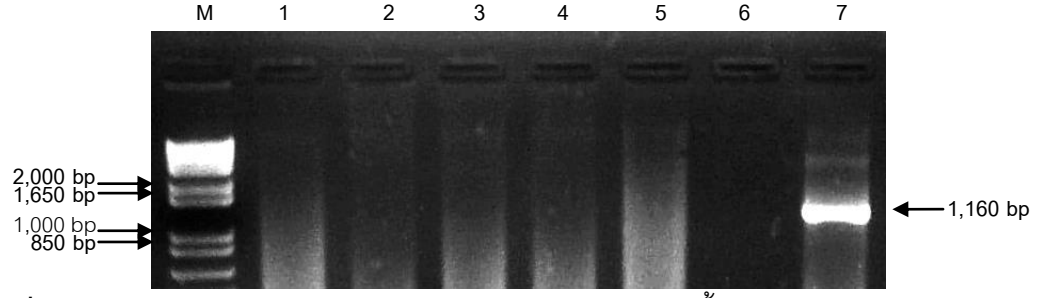
[1/] DAT = ต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี, ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้น, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถว

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของ ปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.270 ± 0.037) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)



ภาพที่ 4 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลอง-บิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 1-15

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 3-1
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 4-1
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 8-1
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 4-2
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 8-2
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 9-2
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 2-3
ช่องที่	8	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 5-3
ช่องที่	9	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 8-3
ช่องที่	10	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 1-4
ช่องที่	11	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 4-4
ช่องที่	12	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 10-4
ช่องที่	13	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 1-5
ช่องที่	14	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 6-5
ช่องที่	15	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 9-5
ช่องที่	16	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	17	Deionized water
ช่องที่	18	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลอง-บิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ลำดับต้นที่ 16-20

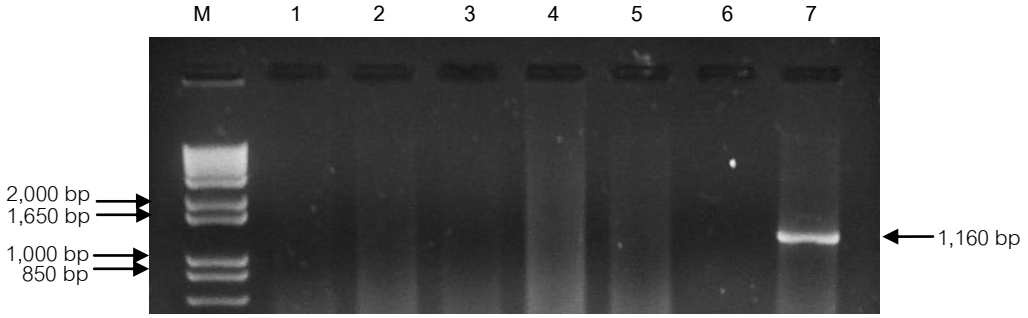
ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 5-1
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 7-1
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 1-3
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 9-3
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอจากส้มโอ DAT 3-4
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

ตารางที่ 4 ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสตเตซาไวรัสจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 1-20

ลำดับต้นในแปลงปลูก[1/]	ELISA
	OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)[2/]
SPT 1-2	0.320 ± 0.006
SPT 1-3	0.203 ± 0.001
SPT 2-3	0.117 ± 0.011
SPT 2-5	0.302 ± 0.021
SPT 3-3	0.156 ± 0.051
SPT 3-5	0.266 ± 0.035
SPT4-5	0.190 ± 0.011
SPT5-2	0.236 ± 0.008
SPT5-4	0.273 ± 0.004
SPT6-3	0.196 ± 0.004
SPT7-3	0.162 ± 0.016
SPT7-4	0.256 ± 0.005
SPT8-4	0.227 ± 0.027
SPT10-2	0.180 ± 0.005
SPT11-5	1.447 ± 0.046
SPT12-4	0.176 ± 0.009
SPT12-5	0.219 ± 0.001
SPT13-2	0.266 ± 0.016
SPT13-3	0.284 ± 0.001
SPT14-4	0.187 ± 0.006

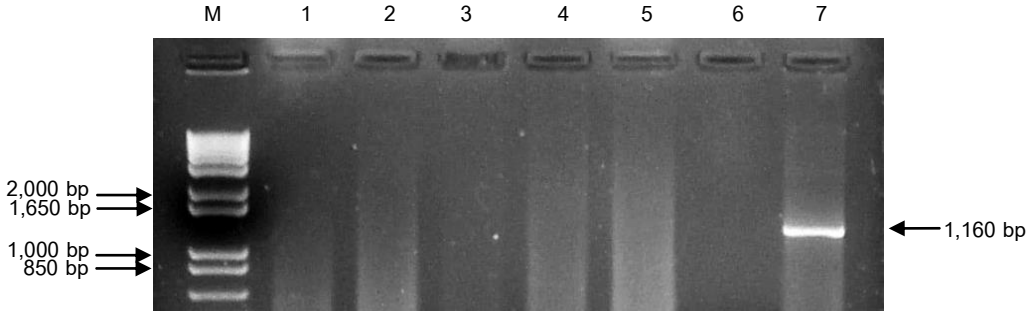
[1/] SPT = ต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี, ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้น, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถว

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.270 ± 0.037) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)



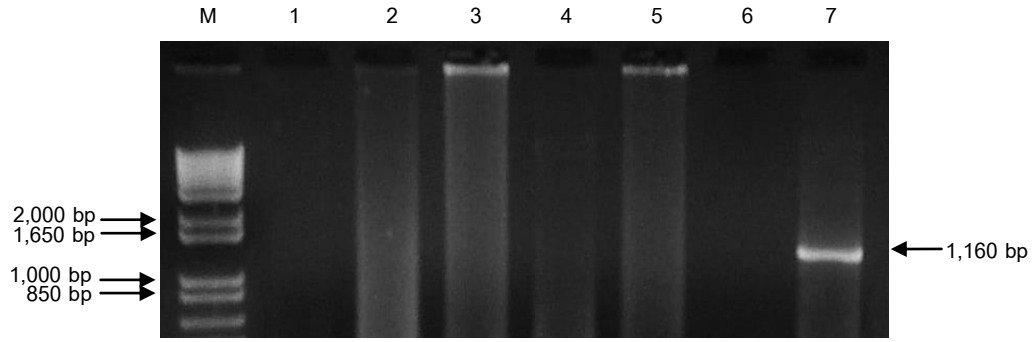
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลอง-บิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 1-5

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 1-2
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 5-2
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 10-2
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 13-2
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 1-3
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



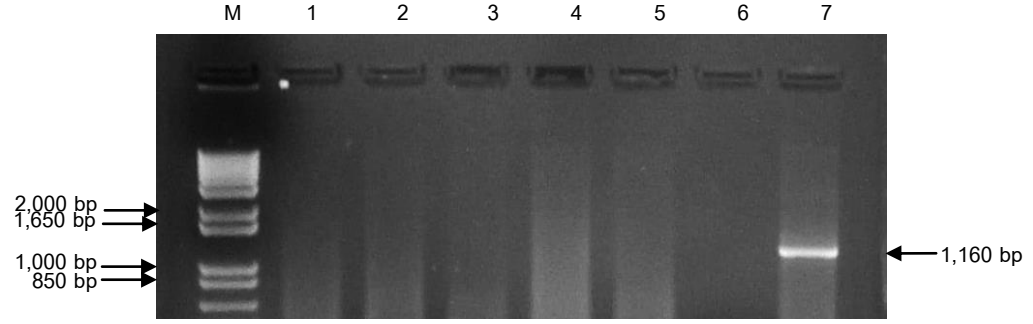
ภาพที่ 7 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลอง-บิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 6-10

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 2-3
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 3-3
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 6-3
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 7-3
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 13-3
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลอง-บิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 11-15

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 5-4
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 7-4
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 8-4
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 12-4
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 14-4
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



ภาพที่ 9 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลอง-บิงโดยเทคนิคพีซีอาร์จากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ลำดับต้นที่ 16-20

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 2-5
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 3-5
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 4-5
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 11-5
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอจากส้มโอ SPT 12-5
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

(ก)

(ข)

ภาพที่ 10 ต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูกที่ได้รับคัดเลือกเพื่อใช้ในการผลิตต้นแม่พันธุ์โดยวิธีการตอนกิ่ง

(ก) ต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 4 ปี

(ข) ต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุ 8 ปี

1.2 ผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอจากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง

ผลการผลิตต้นแม่พันธุ์จากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง ดังสรุปไว้ในตารางที่ 5 พบว่าการตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกสวนที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจเชื้อ และกลุ่มที่ไม่มีการตรวจเชื้อ A1B1 และ A1B2 มีอัตราการรอดสูงสุด คือ 77% (77 กิ่งจาก 100 กิ่ง) รองลงมาคือการตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจเชื้อ A2B1 มีอัตรารอดคิดเป็น 56% (56 กิ่งจาก 100 กิ่ง) และการตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ไม่มีการตรวจเชื้อ A2B2 มีอัตรารอดต่ำที่สุด คือ 44% (44 กิ่งจาก 100 กิ่ง) ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสุ่มตลอด พบว่าหน่วยการทดลอง A1B1 และ A1B2 ผลิตกิ่งตอนได้สูงสุด มีความแตกต่างกับ หน่วยการทดลอง A2B1 และ A2B2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหน่วยการทดลอง A2B1 มีความแตกต่างกับหน่วยการทดลอง A2B2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) และในการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมโดยมีปัจจัยที่ 1 เป็นอายุของต้นในแปลงปลูกที่ใช้ตอนกิ่งผลิตเป็นต้นแม่พันธุ์ ปัจจัยที่ 2 เป็นการตรวจเชื้อ และไม่ตรวจเชื้อต้นในแปลงปลูก ไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสอง แต่เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่ 1 ซึ่งเป็นอายุของต้นในแปลงปลูก 4 ปี และอายุของต้นในแปลงปลูก 8 ปี ใช้ตอนกิ่งผลิตเป็นต้นแม่พันธุ์พบว่ามีปฏิกิริยาสัมพันธ์กัน (ตารางภาคผนวกที่ 5)

กิ่งตอนที่ใช้ผลิตเป็นต้นแม่พันธุ์มีอายุครบ 6 เดือน (ภาพที่ 11) ตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาและโรคฮวงลองบิงซ้ำอีกครั้ง ผลการตรวจเชื้อพบว่าต้นแม่พันธุ์เจริญจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกสวนที่มีอายุต้น 4 ปี จากกลุ่มตรวจโรคและไม่ตรวจโรครวมจำนวน 154 ต้น ปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิง เนื่องจากค่า OD 405 ของปฏิกิริยา ELISA ของต้นแม่พันธุ์เหล่านี้อยู่ระหว่าง ($\bar{x}$ ± SD = 0.182 ± 0.002 – 0.311 ± 0.024) ใกล้เคียงกับปฏิกิริยาที่ได้จากต้นส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.232 ± 0.016) (ตารางภาคผนวก ข. ที่ 1 และ 2) และไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) จากดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นแม่พันธุ์ทั้ง 154 ต้น (ภาพภาคผนวก ค. ที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8) ส่วนผลการตรวจเชื้อในต้นแม่พันธุ์ที่เจริญจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกสวนที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจเชื้อ 56 ต้น ของกลุ่มที่ไม่มีการตรวจเชื้อ 44 ต้น ปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา เนื่องจากค่า OD 405 ของปฏิกิริยา ELISA ของต้นแม่พันธุ์อยู่ระหว่าง ($\bar{x}$ ± SD = 0.054 ± 0.003 – 0.107 ± 0.021) ใกล้เคียงกับปฏิกิริยาที่ได้จากต้นส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.059 ± 0.009) (ตารางภาคผนวก ข. ที่ 3 และ 4) และต้นแม่พันธุ์ที่เจริญจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุต้น 8 ปี ปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง 99 ต้น (ภาพภาคผนวก ค. ที่ 9, 10, 11, 12, 13, 14,15 และ 16) และตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคดังกล่าว 1/ 44 ต้น จากกลุ่มที่ไม่มีการตรวจเชื้อ (ภาพภาคผนวก ค. ที่ 14)

ตารางที่ 5 ผลการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยวิธีการตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูก

หน่วยการทดลอง [1/]	จำนวนกิ่งตอนที่ผลิตได้ในแต่ละซ้ำ [2/]										รวม (ต้น)	ค่าเฉลี่ยกิ่งตอนที่ผลิตได้ (ต้น) ± SE [3/]
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
A1B1	8	8	8	7	7	7	8	8	8	8	77	7.7 ± 0.15[a]
A1B2	8	7	8	8	8	8	8	7	7	8	77	7.7 ± 0.15[a]
A2B1	6	6	6	6	5	6	6	6	5	4	56	5.6 ± 0.22[b]
A2B2	5	3	6	6	5	5	3	0	5	6	44	4.4 ± 0.60[c]
C.V. (%)												16.80

[1/] A1B1 = ตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 4 ปีผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A1B2 = ตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 4 ปีไม่มีการตรวจโรค

A2B1 = ตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 8 ปีผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A2B2 = ตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกอายุต้น 8 ปีไม่มีการตรวจโรค

[2/] ต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนโดยทำการตอน 10 กิ่งต่อต้นในแปลงปลูกหนึ่งต้นต่อซ้ำ

[3/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันในแนวคอลัมน์ แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$

ภาพที่ 11 ต้นแม่พันธุ์ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามอายุ 6 เดือน เจริญจากกิ่งตอนจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อและไม่มีการตรวจเชื้อ (ซ้าย) และจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อและไม่มีการตรวจเชื้อ (ขวา) ปลูกเลี้ยงในโรงเรือนตาข่ายกันแมลง

2. ผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ผลการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอโดยการติดตาบนต้นตอดังสรุปในตารางที่ 6 พบว่าการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ซึ่งผ่านการตรวจโรคและติดบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดี (A2B1C1) ผลิตกิ่งพันธุ์ได้สูงสุด คือ 25 ต้นต่อ 25 ตา รองลงมาคือการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 8 ปี แต่ไม่มีการตรวจโรคและติดบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทองดี (A2B2C1) และการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อและติดบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (A1B1C2) ผลิตได้ 24 ต้นต่อ 25 ตาเท่ากัน และหน่วยการทดลองที่ผลิตกิ่งพันธุ์ได้ต่ำสุด คือการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจโรค (A2B1C2) และไม่มีการตรวจเชื้อติดบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (A2B2C2) คือ 15 ต้นต่อ 25 ตาเท่ากัน (ตารางที่ 6) ผลการวิเคราะห์ทางเดียว (one-way analysis) แบบสุ่มตลอด (completely randomize design) พบว่าหน่วยการทดลอง A2B1C1 ซึ่งผลิตกิ่งพันธุ์ได้สูงสุด แต่ไม่มีความแตกต่างจากหน่วยการทดลอง A1B1C1, A1B2C1, A1B1C2 และ A1B2C2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ามีความแตกต่างจากหน่วยการทดลอง A2B1C2 และ A2B2C2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) และในการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม (factorial design) โดยมีปัจจัยที่ 1 เป็นอายุของต้นในแปลงปลูกที่ใช้ตอนกิ่งเป็นต้นแม่พันธุ์ซึ่งเป็นแหล่งของตา ปัจจัยที่ 2 เป็นการตรวจเชื้อ และไม่ตรวจเชื้อต้นในแปลงปลูกที่ใช้ผลิตเป็นต้นแม่พันธุ์ และปัจจัยที่ 3 เป็นต้นตอ (ส้มโอพันธุ์ทองดี และส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม) ไม่พบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทั้งสาม (ตารางภาคผนวก ข. ที่ 6)

จากการติดตามการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้พบว่าหลังจากตัดปลายยอดของต้นตอประมาณ 5 เซนติเมตร เหนือรอยติดตาในสัปดาห์ที่ 6 (ภาพที่ 12ก) จะมีการเจริญของตาโดยเฉลี่ยภายใน 1-3 สัปดาห์ (ภาพที่ 12ข และ 12ค) และกิ่งพันธุ์จะเจริญเติบโตเต็มที่ภายในระยะเวลา 2-3 เดือน (ภาพที่ 12ง) จากนั้นทำการตรวจเชื้อในกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้ทั้งหมด 163 ต้น ผลปรากฏว่ากิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้ปลอดจากเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา 163 ต้น เนื่องจากมีค่า OD 405 ของปฏิกิริยา ELISA ของกิ่งพันธุ์อยู่ระหว่าง ($\bar{x}$ ± SD = 0.086 ± 0.021 - 0.156 ± 0.002) ใกล้เคียงกับปฏิกิริยาที่ได้จากต้นส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.127 ± 0.048) (ตารางที่ 7 และ 8) และไม่พบผลผลิตพีซีอาร์ของเชื้อฮวงลองบิงจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้ทั้ง 163 ต้น (ภาพที่ 13 และ 14)

ตารางที่ 6 ผลการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยวิธีการติดตา

หน่วยการทดลอง [1/]	จำนวนกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้ในแต่ละซ้ำ[2/]					รวม	ค่าเฉลี่ยกิ่งพันธุ์ที่
	1	2	3	4	5	(ต้น)	ผลิตได้ (ต้น) ± SE[3/]
A1B1C1	0	4	4	5	4	17	3.4 ± 0.87^{ab}
A1B2C1	4	5	2	5	5	21	4.2 ± 0.58^{ab}
A1B1C2	5	4	5	5	5	24	4.8 ± 0.2^{ab}
A1B2C2	5	5	5	2	5	22	4.4 ± 0.6^{ab}
A2B1C1	5	5	5	5	5	25	5.0 ± 0.0^{a}
A2B2C1	4	5	5	5	5	24	4.8 ± 0.2^{ab}
A2B1C2	2	5	2	5	1	15	3.0 ± 0.84^{b}
A2B2C2	3	4	3	1	4	15	3.0 ± 0.55^{b}
C.V. (%)							30.92

[1/] A1B1C1 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A1B2C1 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A1B1C2 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

A1B2C2 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

A2B1C1 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

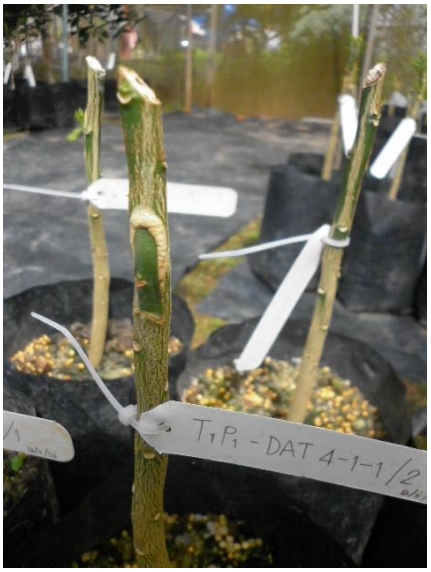
A2B2C1 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

A2B1C2 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

A2B2C2 = ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม

[2/] ใช้ตาจำนวน 5 ตา จากต้นแม่พันธุ์หนึ่งต้น และต้นแม่พันธุ์หนึ่งต้นต่อซ้ำ

[3/] ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรแตกต่างกันในแนวคอลัมน์ แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $p \leq 0.05$



(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 12 การเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามปลอดโรคหลังจากติดตาบนต้นตอเป็นระยะเวลาต่างๆ

(ก) ตัดปลายยอดต้นตอเหนือรอยติดตา 5 เซนติเมตร

(ข) ยอดอ่อนเจริญจากตาหลังจากตัดปลายยอดต้นตอ 1 สัปดาห์

(ค) ยอดอ่อนเจริญจากตาหลังจากตัดปลายยอดต้นตอ 3 สัปดาห์

(ง) กิ่งพันธุ์ (ติดตา) ส้มโอทับทิมสยามอายุ 3 เดือน หลังจากตัดปลายยอดต้นตอ

ตารางที่ 7 ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามผลิตโดยการติดตาบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ลำดับต้นแม่พันธุ์ [1/] (แหล่งของตา)	จำนวนกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้	ผลการตรวจเชื้อ CTV ELISA[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
A1B1		
DAT 1-3-1	5	0.049 ± 0.000
DAT 4-1-3	5	0.050 ± 0.006
DAT 9-2-3	4	0.050 ± 0.000
DAT 9-3-1	5	0.051 ± 0.003
DAT 10-4-1	5	0.046 ± 0.002
A1B2		
DAT 2-4-3	2	0.049 ± 0.001
DAT 3-5-2	5	0.048 ± 0.001
DAT 4-3-1	5	0.076 ± 0.001
DAT 5-2-4	5	0.047 ± 0.000
DAT 6-1-1	5	0.059 ± 0.002
A2B1		
SPT 1-3-1	2	0.043 ± 0.001
SPT 3-3-1	5	0.049 ± 0.000
SPT 7-3-1	2	0.045 ± 0.001
SPT 12-4-2	5	0.049 ± 0.000
SPT 12-5-1	1	0.049 ± 0.001
A2B2		
SPT 3-4-2	3	0.044 ± 0.001
SPT 5-3-4	4	0.053 ± 0.005
SPT 6-4-4	1	0.046 ± 0.002
SPT 9-2-1	3	0.052 ± 0.000
SPT 13-5-2	4	0.046 ± 0.001

[1/] A1B1 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A1B2 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ

A2B1 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A2B2 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ

ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้น, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถว, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/]ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.132 ± 0.013) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)

ตารางที่ 8 ผลการตรวจเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามผลิตโดยการติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี

ต้นแม่พันธุ์[1/] (แหล่งของตา)	จำนวนกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้	ผลการตรวจเชื้อ CTV ELIS[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
A1B1		
DAT1-3-1	4	0.089 ± 0.013
DAT 4-1-3	0	0
DAT 9-2-3	4	0.089 ± 0.013
DAT 9-3-1	2	0.089 ± 0.013
DAT 9-3-1	3	0.109 ± 0.016
DAT10-4-1	4	0.109 ± 0.016
A1B2		
DAT 2-4-3	2	0.078 ± 0.059
DAT 2-4-3	3	0.108 ± 0.009
DAT 3-5-2	5	0.108 ± 0.009
DAT 4-3-1	2	0.078 ± 0.059
DAT 5-2-4	5	0.078 ± 0.059
DAT 6-1-1	3	0.109 ± 0.016
DAT 6-1-1	1	0.078 ± 0.059
A2B1		
SPT 1-3-1	2	0.108 ± 0.009
SPT 1-3-1	3	0.105 ± 0.001
SPT 3-3-1	5	0.105 ± 0.001
SPT 7-3-1	2	0.105 ± 0.001
SPT 7-3-1	3	0.075 ± 0.008
SPT 12-4-2	5	0.075 ± 0.008
SPT 12-5-1	2	0.075 ± 0.008
SPT 12-5-1	3	0.073 ± 0.013
A2B2		
SPT 3-4-2	5	0.033 ± 0.042
SPT 5-3-4	3	0.073 ± 0.013
SPT 5-3-4	2	0.033 ± 0.042
SPT 6-4-4	3	0.033 ± 0.042
SPT 6-4-4	2	0.025 ± 0.017
SPT 9-2-1	4	0.073 ± 0.013
SPT13-5-2	5	0.025 ± 0.017

[1/] A1B1 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

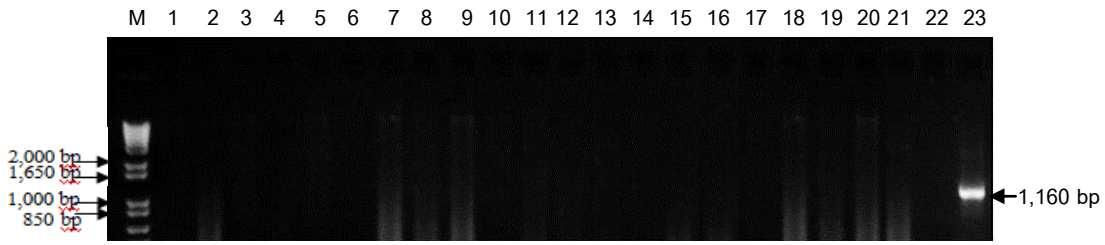
A1B2 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ

A2B1 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบ

A2B2 = ต้นแม่พันธุ์ มาจากต้นในแปลงที่มีอายุต้น 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ

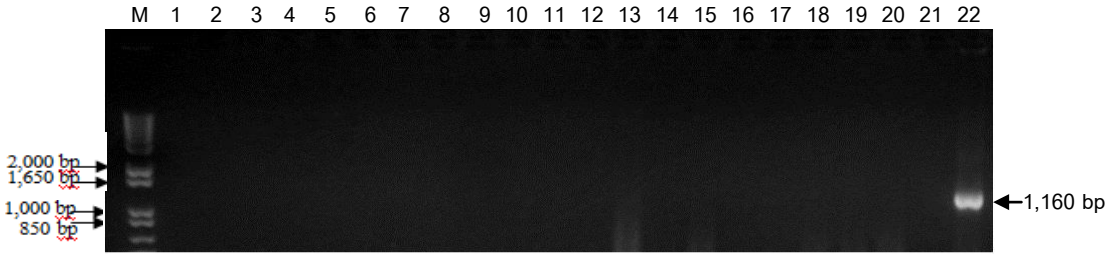
ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้น, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถว, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA จากมะนาวปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.020 ± 0.030) วิเคราะห์ค่าเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริเตซาไวรัส) เมื่อค่าปฏิกิริยาสูงกว่า 0.184 ตามวิธีการของ Bioreba (2011) ดังภาพภาคผนวก ค ที่ 17



ภาพที่ 13 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิง โดยเทคนิคพีซีอาร์จากกิ่งติดตาส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT1-3-1
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 4-1-3
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 9-2-3
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 9-3-1
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT10-4-1
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 2-4-3
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 3-5-2
ช่องที่	8	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 4-3-1
ช่องที่	9	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 5-2-4
ช่องที่	10	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 6-1-1
ช่องที่	11	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 1-3-1
ช่องที่	12	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 3-3-1
ช่องที่	13	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 7-3-1
ช่องที่	14	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 12-4-2
ช่องที่	15	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 12-5-1
ช่องที่	16	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 3-4-2
ช่องที่	17	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 5-3-4
ช่องที่	18	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 6-4-4
ช่องที่	19	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 9-2-1
ช่องที่	20	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 13-5-2
ช่องที่	21	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	22	Deionized water
ช่องที่	23	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง



ภาพที่ 14 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิง โดยเทคนิคพีซีอาร์จากกิ่งติดตาส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามบนต้นตอส้มโอทองดี

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT1-3-1
ช่องที่	2	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 9-2-3
ช่องที่	3	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 9-3-1
ช่องที่	4	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT10-4-1
ช่องที่	5	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 2-4-3
ช่องที่	6	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 3-5-2
ช่องที่	7	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 4-3-1
ช่องที่	8	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 5-2-4
ช่องที่	9	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ DAT 6-1-1
ช่องที่	10	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 1-3-1
ช่องที่	11	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 3-3-1
ช่องที่	12	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 7-3-1
ช่องที่	13	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 12-4-2
ช่องที่	14	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 12-5-1
ช่องที่	15	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 3-4-2
ช่องที่	16	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 5-3-4
ช่องที่	17	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 6-4-4
ช่องที่	18	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 9-2-1
ช่องที่	19	ดีเอ็นเอของกิ่งพันธุ์ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ SPT 13-5-2
ช่องที่	20	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	21	Deionized water
ช่องที่	22	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง

บทที่ 4

วิจารณ์

1. คัดเลือกต้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูก

ผลการตรวจเชื้อในส้มโอจากแปลงปลูกที่มีอายุต้น 4 ปี และ 8 ปี พบเชื้อทริสเตซาไวรัส 35% และ 25% ตามลำดับ และพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงคิดเป็น 5% ในส้มโอของแปลงปลูกอายุ 4 ปี เท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของรัตนา สดุดี และคณะ (2551) ซึ่งตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส 85% ของตัวอย่างส้มโชกุน ส้มจุก ส้มเขียวหวาน และมะนาว ที่เก็บจากพื้นที่ปลูกส้มในภาคใต้ คือ นครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา ตรัง และยะลา พบว่าเชื้อทริสเตซาไวรัสแพร่ระบาดในส้มโอทับทิมสยามต่ำกว่าส้มชนิดอื่น ในขณะที่พบการแพร่ระบาดของโรคฮวงลองบิงในส้มโอทับทิมสยามใกล้เคียงกับที่เกิดขึ้นกับส้มโอในจังหวัดเชียงราย คือ 5-10% (ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล, 2552)

การตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค ELISA พบตัวอย่างส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามให้ค่า OD 405 ของปฏิกิริยา ELISA สูงกว่าสองเท่าของค่า OD 405 มะนาวปกติเพียงเล็กน้อยจำนวนหลายตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ดังนั้นจึงใช้วิธีประเมินการติดเชื้อไวรัสโดยวิธีของ Bioreba (2011) ดังแสดงไว้ในตารางภาคผนวก ค ที่ 1 เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาตัวอย่างติดเชื้อไม่แท้ (false positive) ซึ่งเกิดจากการประเมินผลด้วยการเปรียบเทียบกับค่า OD 405 ของพืชปกติ นอกจากนั้น Yokomi และ Polek (2011) รายงานการเก็บตัวอย่างส้มแมนดารินในเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม เมื่อตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค ELISA พบว่าตัวอย่างส้มแมนดารินให้ค่า OD 405 สูงกว่าค่าของ Sweet orange ปกติ ซึ่งแปลผลได้ว่าตัวอย่างเหล่านั้นติดเชื้อไวรัส แต่เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวไปตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสซ้ำอีกครั้งโดยวิธีการ immunocapture RT- PCR ผลการตรวจเชื้อระบุว่าไม่พบเชื้อทริสเตซาไวรัส ดังนั้นเขาจึงสรุปว่าในบางฤดูกาลส้มแมนดารินตอบสนองต่อแอนติบอดี้ของเชื้อทริสเตซาไวรัส โดยที่ไม่มีการปรากฏของเชื้อไวรัสแต่อย่างใด

2. ผลิตต้นแม่พันธุ์จากส้มโอในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง

จากการผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่ง พบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงในต้นแม่พันธุ์ 1 ต้นในกลุ่มที่ไม่มีการตรวจเชื้อ การไม่ตรวจโรคมีความเสี่ยงต่อการได้กิ่งตอนที่ติดเชื้อ แต่ที่เกิดขึ้นน้อยเพราะผลการทดลองที่ 1 แสดงให้เห็นว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงในปริมาณที่ต่ำทั้งสองสวน และพบว่ากิ่งตอนจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี มีอัตราการรอดสูงกว่ากิ่งตอนจากสวนที่มีอายุต้น 8 ปี เนื่องจากว่ากิ่งตอนส่วนใหญ่อายุกิ่งไม่เกิน 1 ปี และเป็นกิ่งที่อยู่ในแนวตั้ง ซึ่งสอดคล้องกับหลักการขายพันธุ์พืชของ สรรเสริญ วันจันทร์ (2555) ต้นแม่พันธุ์จากกิ่งตอนสามารถผลิตตาเพื่อใช้ในการผลิตกิ่งพันธุ์ได้ภายใน 6 เดือน หลังจากย้ายปลูก สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Sdoodee และคณะ (2008) ที่ทำการผลิตต้นแม่พันธุ์ปลอดโรคของส้มจุกซึ่งเจริญมาจากกิ่งชำ

3. ผลิตกิ่งพันธุ์ปลอดโรคของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

การใช้ต้นตอส้มโอทับทิมสยามและต้นตอส้มโอทองดีในการผลิตกิ่งพันธุ์มีผลตออัตราการรอดของตาไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งอัตรารอดของการใช้ตาติดบนตอส้มโอทองดีในแต่ละหน่วยการทดลองอยู่ระหว่าง 67-100% และบนต้นตอส้มโอทับทิมสยามอยู่ระหว่าง 60-96% ซึ่งงานวิจัยของ Sdoodee และคณะ (2008) ทำการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มจุกปลอดโรคโดยวิธีการติดตาบนต้นตอทรอยเยอร์ (Troyer) มีอัตราการรอดของกิ่งติดตา 80% และการทดลองของสุดาวรรณ มีเจริญ และคณะ (2550) ทำการผลิตกิ่งพันธุ์โดยการติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์โวลคาเมอริน่าและต้นตอทรอยเยอร์มีอัตรารอด 70% และพบว่าการติดตาบนต้นตอสามารถติดได้ทุกๆ เดือน ไม่มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความพร้อมของกิ่งตาและต้นตอที่ใช้ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ เมื่อพิจารณาผลการทดลองครั้งนี้ในแต่ละหน่วยการทดลองพบว่ามีอัตราการรอดใกล้เคียงกัน ยกเว้นหน่วยการทดลองที่ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม และหน่วยการทดลองที่ใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยามมีอัตรารอดของตาต่ำอาจเกิดจากความผิดพลาดในการพันรัดตาเข้ากับต้นตอไม่แน่นพอทำให้ไม่เกิดการเชื่อมต่อของเนื้อเยื้อระหว่างตาและต้นตอ เป็นผลให้ตาเน่าเสียไม่เจริญเป็นต้น

บทที่ 5

สรุป

การตรวจเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา และโรคฮวงลองบิงของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี จำนวน 20 ต้น พบเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา 7 ต้น และพบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง 1 ต้น ส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุต้น 8 ปี จำนวน 20 ต้น พบเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา 5 ต้น และไม่พบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง จึงสามารถคัดเลือกต้นที่ผ่านการตรวจเชื้อแล้วไม่พบได้จำนวน 10 ต้น และคัดเลือกต้นในแปลงปลูกที่ไม่มีการตรวจเชื้อจำนวน 10 ต้น จากทั้งสองแปลงปลูกเพื่อใช้ตอนกิ่งในการผลิตต้นแม่พันธุ์

การผลิตต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามจากต้นในแปลงปลูกโดยการตอนกิ่งรวมทั้งหมดจำนวน 254 ต้น ต้นส้มโอจากแปลงปลูกที่มีอายุต้น 4 ปี มีอัตราการรอดของกิ่งตอน 77% เท่ากันทั้งสองกลุ่ม และส้มโอจากแปลงปลูกที่มีอายุต้น 8 ปี กลุ่ม 1 มีอัตราการรอดของกิ่งตอน 56% และกลุ่ม 2 มีอัตราการรอดของกิ่งตอน 44% การตอนกิ่งจากต้นส้มโอในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี มีอัตรารอดสูงที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการตอนกิ่งจากต้นส้มในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี ต้นแม่พันธุ์ที่เจริญจากกิ่งตอนจำนวน 253 ต้นจาก 254 ต้น ปลอดจากโรคทั้งสองชนิด แต่พบการติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงในต้นแม่พันธุ์ 1 ต้นจาก 254 ต้น ซึ่งเป็นต้นที่เจริญมาจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่มีการตรวจโรค

การผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามโดยการติดตาบนต้นตอ พบว่าการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ซึ่งผ่านการตรวจเชื้อ และติดบนต้นตอส้มโอทองดี (A2B1C1) ให้ผลผลิตสูงสุดคือ 25 ต้นต่อ 25 ตา แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อและติดบนต้นตอส้มโอทองดี (A1B1C1) การใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 4 ปี ไม่ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทองดี (A1B2C1) การใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม (A1B1C2) การใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นอายุ 4 ปี ไม่ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอส้มโอทับทิมสยาม (A1B2C2) และการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่ง

มาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ซึ่งไม่มีการตรวจเชื้อ และติดบนต้นตอส้มโอทองดี (A2B2C1) แต่การใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ตอนมาจากต้นอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดตาบนต้นตอทองดี (A2B1C1) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อติดบนต้นตอทับทิมสยาม (A2B1C2) และการใช้ตาจากต้นแม่พันธุ์ซึ่งตอนกิ่งมาจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี ไม่ผ่านการตรวจเชื้อติดบนต้นตอส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (A2B1C2) และกิ่งพันธุ์ที่ผลิตได้ทั้งหมดจำนวน 163 ต้น ปลอดจากการติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาและเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง 100% เมื่อตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA และเทคนิค PCR ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

ขวัญดาว ผิวขาว และอังสนา อัครพิศาล. 2552. การตรวจสอบโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ในสวนส้มโอที่ผลิตเพื่อการส่งออกที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย. ว. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 26 : 40-46.

ประดับ กลัดเข็มเพชร. 2552. การปลูกและการขยายพันธุ์ไม้ผล. เชียงใหม่ : เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ 24 หน้า.

ไมตรี พรหมมินทร์. 2548. โรคกรีนนิ่งหรือโรคใบเหลืองต้นโทรม. ว. เคหะการเกษตร 29 : 126-135.

รัตนา สดุดี. 2537. โรคโทรมของส้มจุก (Citrus reticulate Blanco) : เชื้อสาเหตุและปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงของโรค. ว. สงขลานครินทร์ 16 : 353-368.

รัตนา สดุดี, สมปอง เตชะโต และ Josn Milline. 2551. การพัฒนาวิธีการทางเซรุมวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย. สงขลา : รายงานการวิจัยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 118 หน้า.

รัตนา สดุดี, ปิยวิทย์ โทธรรม, ปรีชา ส่งเสริม, อมาวดี ไชยชนะ และอริสา รัตนูปถัมภ์. 2552. ผลกระทบของเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ลำต้นบุ๋มต่อพืชตระกูลส้ม. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8 ณ โรงแรม ดิเอ็มเพรส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่, 6-9 พฤษภาคม 2552. หน้า 106.

ลัดดาวัลย์ สมเพาะ, นิพนธ์ ทวีชัย, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต และอำไพวรรณ ภราดร์นุวัตน์. 2550. การวินิจฉัยโรคทริสเตซาและโรคกรีนนิ่งของมะนาวในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ, 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550. หน้า 226-233.

สารคดีเกษตร. 2010. การผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอปลอดโรค.
http://www.ch 7.com. (เข้าถึงเมื่อ 10 เมษายน 2554).

สุดาวรรณ มีเจริญ, ณัฐพล วิโรจนะ และสุธน สุวรรณบุตร. 2550. เทคโนโลยีการผลิตส้มโอปลอดโรคและการกระจายพันธุ์. กรุงเทพฯ : รายงานการวิจัยกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 66 หน้า.

สรรเสริญ วันจันทร์. 2555. การขยายพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 29 หน้า.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2552. ข้อมูลพื้นฐานเศรษฐกิจการเกษตรปี 2552. กรุงเทพฯ : เอกสารสถิติการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 106 หน้า.

อารมณ์ จันทะสอน, อำไพวรรณ ภราดร์นุวัตน์, ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, จุลภาค คุ้นวงศ์ และนิพนธ์ ทวีชัย. 2550. การวินิจฉัยโรคกรีนนิ่งของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 45 ณ มหาวิทยาลัยเกษตร-ศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ, 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2550. หน้า 218-225.

อำไพวรรณ ภราดร์นุวัตน์ และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2528. โรคของส้มที่เกิดจากเชื้อไวรัสและเชื้อคล้ายไวรัส. ว. พืชสวน 20 : 14-19.

Abbas, M., M.M. Khan., S.M. Mughal., M.J. Jaskani and H. Abbas. 2006. Propagation of CTV-free sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] plant through microbudding technique. Pak. J. Bot. 38 : 583-587.

Bar-Joseph, M., S.M. Garnsey., D. Gonsalves., M. Moscovitz., D.E. Purcifull., M.F. Clark and G. Loebenstein. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. Phytopath. 69 : 190-194.

Bar-Joseph, M., C. Robertson., M.E. Hilf and W.O. Dowson. 2011. A novel method for Citrus propagation: Seed grafting. J. Hort. Science and Biotech. 86 : 616-618.

Bekolo, N., A. Zachee., B.M. Louis and A. Akoa. 2007. Discrimination of citrus tristeza virus (CTV) strains using mexican lime/citrange troyer combinations *(Citrus poncirus/Citrus trifoliate* x *Poncirus sinensis*). Af. J. Biotech. 6 : 375-378.

Bioreba. 2011. Technical Information ELISA Data Analysis. http://www.bioreba.ch/files/Tecnical_Info/ELISA_Data_Analysis.pdf. (accessed October 16, 2012).

Bove, J. M. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Plant Pathol. 88 : 7-37.

da Graca, J.V., J.V. French., P.S. Haslem., M. Skaria., M. Setamou and B. Salas. 2008. Survey for the asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* and citrus huanglongbing (greening disease) in Texas. Plant Science 60 : 21-26.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hick. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1 : 19-21.

Deng, X., J. Chen., Z. Feng., Z. Shan., H. Guo., J. Zhu., H. Li and E. L. Civerolo. 2008. Identification and characterization of the huanglongbing bacterium in pummelo from multiple locations in Guangdong, P. R. China. Plant Dis. 92 : 513-518.

Gemez, H.D. 2008. Experience on HLB (Huanglongbing) symptoms detection in Florida. http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/dowload.asp. (accessed September 3, 2010).

Hansen, A.K., J.T. Trumble., R. Stouthamer and T.D. Paine. 2008. A new huanglong-bing species "*Candidatus* Liberibacter *psyllaurous*" found to infect tomato and potato is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc). App. Environ. Microbiol. 74 : 5862-5865.

Jagoueix, S., J. M. Bove and M. Garnier. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the *Proteobacteria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 40 : 379-386.

Jagoueix, S., J. M. Bove and M. Garnier. 1996. PCR detection of the two '*Candidatus*' Liberobecter species associated with greening disease of citrus. Mol. Cell. Probes 10 : 43-50.

Komazaki, S. 1993. Biology and virus transmission of citrus aphids. http://www.agnet.org/library/tb/136.html. (accessed September 3, 2010).

Lin, H., C. Chen., H. Doddapaneni., Y. Duan., E.L. Civerolo., X. Bai and X. Zhao. 2010. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of Candidatus Liberibacter asiaticus, the bacterium associated with citrus Huanglongbing. J. Microbiol. Methods 81 : 17-25.

NAPPO. 2009. Nappo diagnostic protocol DP no.01 Citrus tristeza virus (CTV). http://www.nappo.org/.../Protocols/PD%20No.01-CTV%20 citrus-e. pdf. (accessed September 3, 2010).

Niblett, C.L., H. Genc., B. Cevik., S. Halbert., L. Brow., G. Nolasco., B. Bonacalza., K.L. Manjunath., V.J. Febres., H.R. Pappu and R.F. Lee. 2000. Progress on strain differentiation of Citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. Virus Research 71 : 97-106.

Rocha-Pena, M.A., R.F. Lee., R. Lastra., C.L. Niblet., F.M. Ochoa-Corona., S.M. Garnsey and R.K. Yokomi. 1995. Citrus tristeza virus and its vector *Toxoptera citricida*. Plant Dis. 79 : 437-444.

Rocha-Pena, M.A., R.F. Lee., R. Lastra and C.L. Niblet. 1993. Effectiveness of different citrus species as donor host for graft transmission of Citrus tristeza virus. Proceedings, 12th Conference, International Organization of Citrus Virologists. p. 84-92.

Roistacher, C.N. 1991. Graft-transmissible diseases of *Citrus*: Handbook for Detection and Diagnoses, International Organization of Citrus Virologist, FAO, Rome, 286 p.

Sdoodee, R. and H. Garnett. 1994. Detection of citrus greening bacterium by immunoblotting. Songklanakarin J. Science and Technol. 16 : 291-300.

Sdoodee, R., Y. Sriboonkong., W. Hongsa and T. Luang-Aram. 1999. Detection and differentiation of bacterium-like organism associated wich citrus greening disease in Thailand by RFLP. APPS 11th Biennial Conference, Canberrra, Australia 27-30 September 1999. (Abstr.)

Sdoodee, R., Y. Sriboonkong and Y. Sutdhikaranya. 2008. Production of disease-free mother trees and budwood of “Neck orange” in Southern Thailand. Acta Hort. 773 : 45-50.

Shokrollah, H., T.L. Abdullah., K. Sijam and S. N. A. Abdullah. 2011. Potential use of selected citrus rootstocks and interstocks against HLB disease in Malaysia. Crop Protection 30 : 521-525.

Teixeira, D.C., J.L. Danet., S. Eveillard., E.C. Martins., W.C.J. Junior., P.T. Yamamoto., S.A. Lopes., R.B. Bassanezi., A.J. Ayres., C. Saillard and J.M. Bove. 2005. Citrus huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil : PCR detection of the '*Candidatus*' Liberobecter species associated with the disease. Mol. Cell. Probes 19 : 173-179.

Teixeira, D.C., C. Saillard., C. Couture., E.C. Martins., N.A. Wulff., S. Jagoueix., P.T. Yamamoto., A.J. Ayres and J.M. Bove. 2008. Distribution and quantification of *Candidatus* Liberibacter americanus agent of huanglongbing disease of citrus in Sao Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR. Mol. Cell. Probes 22 : 139-150.

Verheij Ed. 2004. Propagating and planting trees. Agromisa Foundation, Wageningen, 120 หน้า. http://journeytoforever.org/farm_library/AD19.pdf. (accessed September 10, 2012)

Yokomi, R.K. and M. Polek. 2010. Elevated background in double antibody sandwich-indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of Citrus tristeza virus in mandarin cultivars. Proceedings, 17th Conference, International Organization of Citrus Virologists pp. 36-42.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีในการสกัด DNA

1. สูตรการเตรียม grinding buffer ปริมาตร 1 ลิตร

K_2HPO_4-$3H_2O$	21.7	กรัม (anhydrous = 16.7 กรัม)
KH_2PO_4	4.1	กรัม
Sucrose	100	กรัม
Polyvinylpyrrolidone (Mr 10,000)	20	กรัม

ก่อนนำไปใช้เติม ascorbic acid เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (0.20 มิลลิลิตรต่อ 20 มิลลิลิตรgrinding buffer) และBSA (Bovine serum albumin) ในอัตรา 0.03 กรัมต่อ 20 มิลลิลิตรgrinding buffer แล้วปรับ pH 7.6

2. สูตรการเตรียม CTAB buffer

CTAB (Hexadecyl – trimethyl – ammonium bromide) 2%

NaCl	1.4 M
Tris base	100 mM
EDTA	20 mM
Polyvinylpyrrolidone (Mr 40,000)	1%
Mercaptoethanol	0.2%

สารเคมีในการทำ PCR

3. ส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reagent mixture) 50 ไมโครลิตร

PCR water	311 ไมโครลิตร
10 x buffer	50 ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25 mM)	30 ไมโครลิตร
dNTP mixture (2.5 mM)	50 ไมโครลิตร
Primers	14 ไมโครลิตร
I-Taq	5 ไมโครลิตร
Aliquot	48 ไมโครลิตร

สารเคมีในการทำ Electrophoresis

4. สูตรการเตรียม 5x TBE pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร

Tris base (0.45 M)	54 กรัม
Boric acid (0.45 M)	27.5 กรัม
EDTA Ph 8.0 (0.01 M)	20 มิลลิลิตร (ของ 0.5 M EDTA)

5. สูตรการเตรียม Loading dye (10 มิลลิลิตร)

Glyceral	5 มิลลิลิตร
EDTA (1 mM)	40 ไมโครลิตร (ของ 0.2 M EDTA)
Bromophenol (0.25%)	0.04 กรัม
Xylene cyanol (0.25%)	0.04 กรัม

6. สูตรการเตรียม Agarose gel 1%

Agarose (DNA grade)	0.3 กรัม
0.5x TBE buffer	30 มิลลิลิตร

ก่อนนำไปใช้นำไปหลอมละลายในเตาไมโครเวฟจนเจลละลาย เติม Ethidium bromide ลงไป 3 ไมโครลิตรคนให้เข้ากันแล้วเทลงแผ่นรองรับเจล ทิ้งไว้ประมาณ1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีในการตรวจเชื้อ CTV โดยเทคนิค ELISAในน้ำกลั่น ปริมาตร1 ลิตร

7. สูตรการเตรียม Coating buffer

$Na_2 CO_3$	1.59 กรัม
$NaHCO_3$	2.93 กรัม
NaN_3	0.02 กรัม

8. สูตรการเตรียม Phosphate buffer saline, PBS

NaCl	8.03 กรัม
$KH_2 PO_4$	0.20 กรัม
$NaHPO_4 .12H_2O$ 1.15 กรัม (anhydrous)	2.90 กรัม
KCl	0.02 กรัม

9. สูตรการเตรียม Washing buffer

PBS-T	1.0 กรัม

	Tween-20	0.50 มิลลิกรัม
10.	สูตรการเตรียม Conjugated buffer	
	PBS-T	1.0 ลิตร
	PVP	20.0 กรัม
	Ovalbumin	2.0 กรัม
	NaN_3	0.2 กรัม
11.	สูตรการเตรียม Supstrate buffer	
	Diethanolamine	9.7 มิลลิกรัม
	NaN_3	0.2 กรัม
	ปรับสารละลายเป็น pH 9.68	

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจโรค

ลำดับต้นแม่พันธุ์[1/]	ผลการตรวจเชื้อ CTV ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม
	ELISA[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
DAT 1-3-1	0.166 ± 0.013
DAT 1-3-2	0.161 ± 0.008
DAT 1-3-3	0.177 ± 0.008
DAT 1-3-4	0.173 ± 0.015
DAT 1-3-5	0.170 ± 0.016
DAT 1-3-6	0.186 ± 0.006
DAT 1-3-7	0.178 ± 0.004
DAT 4-1-1	0.155 ± 0.010
DAT 4-1-2	0.155 ± 0.005
DAT 4-1-3	0.159 ± 0.011
DAT 4-1-4	0.149 ± 0.000
DAT 4-1-5	0.171 ± 0.013
DAT 4-1-6	0.152 ± 0.001
DAT 4-1-7	0.177 ± 0.013
DAT 4-1-8	0.167 ± 0.004
DAT 5-1-1	0.152 ± 0.018
DAT 5-1-2	0.170 ± 0.008
DAT 5-1-3	0.152 ± 0.010
DAT 5-1-4	0.157 ± 0.001
DAT 5-1-5	0.159 ± 0.020
DAT 5-1-6	0.169 ± 0.000
DAT 5-1-7	0.201 ± 0.026
DAT 5-1-8	0.154 ± 0.012
DAT 8-2-1	0.147 ± 0.002
DAT 8-2-2	0.186 ± 0.004
DAT 8-2-3	0.174 ± 0.010
DAT 8-2-4	0.176 ± 0.004
DAT 8-2-5	0.159 ± 0.001
DAT 8-2-6	0.168 ± 0.012
DAT 8-2-7	0.163 ± 0.006
DAT 8-2-8	0.182 ± 0.002
DAT 9-2-1	0.175 ± 0.008
DAT 9-2-2	0.140 ± 0.001
DAT 9-2-3	0.166 ± 0.009
DAT 9-2-4	0.183 ± 0.004
DAT 9-2-5	0.168 ± 0.006
DAT 9-2-6	0.155 ± 0.004
DAT 9-2-7	0.176 ± 0.008
DAT 9-3-1	0.183 ± 0.011

[1/] ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถวของต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.292 ± 0.028) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ) ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจโรค

ลำดับต้นแม่พันธุ์[1/]	ผลการตรวจเชื้อ CTV ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม
	ELISA[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
DAT 1-5-1	0.163 ± 0.016
DAT 1-5-2	0.161 ± 0.016
DAT 1-5-3	0.177 ± 0.006
DAT 1-5-4	0.188 ± 0.013
DAT 1-5-5	0.153 ± 0.016
DAT 1-5-6	0.180 ± 0.000
DAT 1-5-7	0.158 ± 0.008
DAT 1-5-8	0.166 ± 0.007
DAT 6-5-1	0.175 ± 0.011
DAT 6-5-2	0.188 ± 0.027
DAT 6-5-3	0.182 ± 0.008
DAT 6-5-4	0.128 ± 0.002
DAT 6-5-5	0.155 ± 0.001
DAT 6-5-6	0.144 ± 0.024
DAT 6-5-7	0.152 ± 0.007
DAT 6-5-8	0.163 ± 0.035
DAT 9-3-2	0.196 ± 0.008
DAT 9-3-3	0.221 ± 0.016
DAT 9-3-4	0.209 ± 0.009
DAT 9-3-5	0.234 ± 0.007
DAT 9-3-6	0.206 ± 0.001
DAT 9-3-7	0.185 ± 0.011
DAT 9-5-1	0.170 ± 0.025
DAT 9-5-2	0.142 ± 0.008
DAT 9-5-3	0.135 ± 0.000
DAT 9-5-4	0.149 ± 0.004
DAT 9-5-5	0.129 ± 0.008
DAT 9-5-6	0.176 ± 0.031
DAT 9-5-7	0.167 ± 0.004
DAT 9-5-8	0.186 ± 0.011
DAT 10-4-1	0.184 ± 0.001
DAT 10-4-2	0.191 ± 0.004
DAT 10-4-3	0.201 ± 0.001
DAT 10-4-4	0.183 ± 0.006
DAT 10-4-5	0.178 ± 0.006
DAT 10-4-6	0.150 ± 0.001
DAT 10-4-7	0.165 ± 0.013
DAT 10-4-8	0.179 ± 0.010

[1/] ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถวของต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.314 ± 0.021) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ไม่มีการตรวจโรค

ลำดับต้นแม่พันธุ์[1/]	ผลการตรวจเชื้อ CTV ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม
	ELISA[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
DAT 1-1-1	0.322 ±0.000
DAT 1-1-2	0.332 ±0.002
DAT 1-1-3	0.377 ±0.027
DAT 1-1-4	0.394 ±0.006
DAT 1-1-5	0.352 ±0.003
DAT 1-1-6	0.500 ±0.011
DAT 1-1-7	0.330 ±0.048
DAT 1-1-8	0.283 ±0.001
DAT 2-2-1	0.278 ±0.009
DAT 2-2-2	0.256 ±0.006
DAT 2-2-3	0.290 ±0.008
DAT 2-2-4	0.313 ±0.013
DAT 2-2-5	0.349 ±0.006
DAT 2-2-6	0.294 ±0.004
DAT 2-2-7	0.294 ±0.006
DAT 2-2-8	0.315 ±0.037
DAT 3-3-1	0.285 ±0.004
DAT 3-3-2	0.258 ±0.016
DAT 3-3-3	0.275 ±0.004
DAT 3-3-4	0.317 ±0.005
DAT 3-3-5	0.365 ±0.026
DAT 3-3-6	0.298 ±0.003
DAT 3-3-7	0.284 ±0.035
DAT 3-3-8	0.286 ±0.004
DAT 4-3-1	0.283 ±0.016
DAT 4-3-2	0.274 ±0.009
DAT 4-3-3	0.281 ±0.021
DAT 5-2-1	0.301 ±0.009
DAT 5-2-2	0.264 ±0.030
DAT 5-2-3	0.335 ±0.010
DAT 5-2-4	0.304 ±0.018
DAT 5-2-5	0.301 ±0.009
DAT 5-2-6	0.341 ±0.017
DAT 5-2-7	0.269 ±0.032
DAT 5-2-8	0.326 ±0.025
DAT 6-1-1	0.261 ±0.003
DAT 6-1-2	0.324 ±0.006
DAT 6-1-3	0.401±0.028
DAT 6-1-4	0.331 ±0.043
DAT 6-1-5	0.312±0.000
DAT 6-1-6	0.450 ±0.023
DAT 6-1-7	0.369 ±0.025

[1/] ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถวของต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.397 ± 0.017) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)

ตารางภาคผนวกที่ 2 (ต่อ) ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากกิ่งตอนของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 4 ปี กลุ่มที่ไม่มีการตรวจโรค

ลำดับต้นแม่พันธุ์[1/]	ผลการตรวจเชื้อ CTV ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม
	ELISA[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
DAT 2-4-1	0.259 ±0.023
DAT 2-4-2	0.225 ±0.004
DAT 2-4-3	0.248 ±0.018
DAT 2-4-4	0.220 ±0.008
DAT 2-4-5	0.284 ±0.012
DAT 2-4-6	0.220 ±0.008
DAT 2-4-7	0.217 ±0.006
DAT 2-4-8	0.207 ±0.001
DAT 4-3-4	0.211 ±0.028
DAT 4-3-5	0.293 ±0.045
DAT 4-3-6	0.235 ±0.000
DAT 4-3-7	0.204 ±0.006
DAT 4-3-8	0.231 ±0.062
DAT 3-5-1	0.233 ±0.011
DAT 3-5-2	0.249 ±0.013
DAT 3-5-3	0.266 ±0.022
DAT 3-5-4	0.235 ±0.004
DAT 3-5-5	0.251 ±0.001
DAT 3-5-6	0.236 ±0.018
DAT 3-5-7	0.270 ±0.027
DAT 8-4-1	0.219 ±0.013
DAT 8-4-2	0.311 ±0.054
DAT 8-4-3	0.290 ±0.015
DAT 8-4-4	0.218 ±0.018
DAT 8-4-5	0.238 ±0.025
DAT 8-4-6	0.219 ±0.006
DAT 8-4-7	0.248 ±0.005
DAT 10-5-1	0.224 ±0.005
DAT 10-5-2	0.233 ±0.003
DAT 10-5-3	0.254 ±0.016
DAT 10-5-4	0.288 ±0.088
DAT 10-5-5	0.230 ±0.004
DAT 10-5-6	0.270 ±0.005
DAT 10-5-7	0.241 ±0.004
DAT 10-5-8	0.267 ±0.006

[1/] ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถวของต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.456 ± 0.001) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากการตอนกิ่งของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ผ่านการตรวจโรค

ลำดับต้นแม่พันธุ์[1/]	ผลการตรวจเชื้อ CTV ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม
	ELISA[2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
SPT 1-3-1	0.086 ± 0.005
SPT 1-3-2	0.102 ± 0.017
SPT 1-3-3	0.104 ± 0.003
SPT 1-3-4	0.084 ± 0.008
SPT 1-3-5	0.081 ± 0.002
SPT 1-3-6	0.087 ± 0.005
SPT 2-3-1	0.069 ± 0.007
SPT 2-3-2	0.090 ± 0.000
SPT 2-3-3	0.108 ± 0.004
SPT 2-3-4	0.097 ± 0.007
SPT 2-3-5	0.097 ± 0.000
SPT 2-3-6	0.089 ± 0.005
SPT 3-3-1	0.088 ± 0.004
SPT 3-3-2	0.077 ± 0.006
SPT 3-3-3	0.073 ± 0.005
SPT 3-3-4	0.092 ± 0.003
SPT 3-3-5	0.078 ± 0.012
SPT 3-3-6	0.094 ± 0.004
SPT 6-3-1	0.100 ± 0.001
SPT 6-3-2	0.105 ± 0.001
SPT 6-3-3	0.104 ± 0.001
SPT 6-3-4	0.089 ± 0.004
SPT 6-3-5	0.078 ± 0.001
SPT 7-3-1	0.076 ± 0.001
SPT 7-3-2	0.087 ± 0.006
SPT 7-3-3	0.101 ± 0.001
SPT 7-3-4	0.094 ± 0.002
SPT 7-3-5	0.081 ± 0.010
SPT 7-3-6	0.092 ± 0.010
SPT 10-2-1	0.115 ± 0.027
SPT 10-2-2	0.123 ± 0.020
SPT 10-2-3	0.120 ± 0.015
SPT 10-2-4	0.089 ± 0.004
SPT 10-2-5	0.084 ± 0.008
SPT 10-2-6	0.078 ± 0.001
SPT 12-4-1	0.068 ± 0.006
SPT 12-4-2	0.091 ± 0.012
SPT 12-4-3	0.084 ± 0.001
SPT 12-4-4	0.090 ± 0.007
SPT 12-4-5	0.094 ± 0.011
SPT 12-4-6	0.076 ± 0.016
SPT 12-5-1	0.053 ± 0.001
SPT 12-5-2	0.076 ± 0.013
SPT 12-5-3	0.057 ± 0.011
SPT 12-5-4	0.055 ± 0.003
SPT 14-4-1	0.095 ± 0.002
SPT 14-4-2	0.079 ± 0.001
SPT 14-4-3	0.070 ± 0.002
SPT 14-4-4	0.061 ± 0.008
SPT 14-4-5	0.063 ± 0.008
SPT 14-4-6	0.054 ± 0.000
SPT 14-5-1	0.113 ± 0.033
SPT 14-5-2	0.061 ± 0.009
SPT 14-5-3	0.060 ± 0.010
SPT 14-5-4	0.060 ± 0.000
SPT 14-5-5	0.067 ± 0.011

[1/] ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถวของต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.126 ± 0.013) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัส)

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการตรวจหาเชื้อซิตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตจากการตอนกิ่งของต้นในแปลงปลูกที่มีอายุ 8 ปี กลุ่มที่ไม่มีการตรวจโรค

ลำดับต้นแม่พันธุ์ [1/]	ผลการตรวจเชื้อ CTV และเชื้อ HLB ในส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม
	ELISA [2/] OD 405 ($\bar{x}$ ± SD)
SPT 2-2-1	0.055 ± 0.008
SPT 2-2-2	0.059 ± 0.006
SPT 2-2-3	0.066 ± 0.010
SPT 2-2-4	0.073 ±0.003
SPT 2-2-5	0.077 ±0.011
SPT 3-4-1	0.079 ±0.004
SPT 3-4-2	0.068 ±0.003
SPT 3-4-3	0.072 ±0.005
SPT 3-4-4	0.100 ±0.039
SPT 3-4-5	0.066 ±0.006
SPT 5-3-1	0.072 ±0.001
SPT 5-3-2	0.058 ±0.002
SPT 5-3-3	0.075 ±0.006
SPT 5-3-4	0.069 ±0.005
SPT 5-3-5	0.070 ±0.015
SPT 5-3-6	0.070 ±0.013
SPT 5-5-0	0
SPT 6-4-1	0.056 ±0.007
SPT 6-4-2	0.059 ±0.002
SPT 6-4-3	0.062 ±0.004
SPT 6-4-4	0.053 ±0.001
SPT 6-4-5	0.061 ±0.007
SPT 8-3-1	0.069 ±0.005
SPT 8-3-2	0.099 ±0.018
SPT 8-3-3	0.101 ±0.032
SPT 8-3-4	0.059 ±0.010
SPT 8-3-5	0.066 ±0.004
SPT 8-3-6	0.066 ±0.010
SPT 8-5-1	0.063 ±0.009
SPT 8-5-2	0.058 ±0.002
SPT 8-5-3	0.055 ±0.004
SPT 8-5-4	0.045 ±0.003
SPT 8-5-5	0.042 ±0.008
SPT 9-2-1	0.074 ±0.003
SPT 9-2-2	0.078 ±0.002
SPT 9-2-3	0.070 ±0.011
SPT 9-4-1	0.056 ±0.004
SPT 9-4-2	0.063 ±0.006
SPT 9-4-3	0.058 ±0.009
SPT 13-5-1	0.043 ±0.006
SPT 13-5-2	0.068 ±0.016
SPT 13-5-3	0.060 ±0.001
SPT 13-5-4	0.059 ±0.006
SPT 13-5-5	0.052 ±0.007
SPT 13-5-6	0.047 ±0.001

[1/] ตัวเลขตัวแรก = ลำดับต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 2 = ลำดับแถวของต้นในแปลง, ตัวเลขตัวที่ 3 = ลำดับกิ่งตอน

[2/] ค่าดูดกลืนแสง OD 405 ($\bar{x}$ ± SD) ของปฏิกิริยา ELISA ของตัวอย่างส้มโอสูงเป็น 2 เท่า ของปฏิกิริยา ELISA จากส้มโอปกติ ($\bar{x}$ ± SD = 0.104 ± 0.007) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)

ตารางภาคผนวกที่ 5 ANOVA (Analysis of variance) ปัจจัยการตอนกิ่งส้มโอทับทิมสยาม

ปัจจัย[1/]	df	SS	MS	F	Pr>F[2/]
ปัจจัย A	1	7.29	7.29	6.401	< .0001***
ปัจจัย B	1	3.6	3.6	3.16	0.0839ns
ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง A กับ B	1	3.6	3.6	3.16	0.0839ns
ความคลาดเคลื่อน	36	41	1.1389		
รวม	39	121.1			

[1/] ปัจจัย A ต้นส้มโอในแปลงปลูก A1= อายุต้น 4 ปี A2= อายุต้น 8 ปี

ปัจจัย B ต้นส้มโอในแปลงปลูก B1= ผ่านการตรวจเชื้อ B2= ไม่มีการตรวจเชื้อ

[2/] ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ *** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 0.001

ตารางภาคผนวกที่ 6 ANOVA (Analysis of variance) ปัจจัยการผลิตกิ่งพันธุ์ส้มโอทับทิมสยาม

ปัจจัย[1/]	df	SS	MS	F	Pr>F[2/]
ปัจจัย A	1	0.625	0.625	0.39	0.5348ns
ปัจจัย B	1	3.025	3.025	1.91	0.1770ns
ปัจจัย C	1	0.025	0.025	0.02	0.9009ns
ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง A กับ B	1	18.225	18.225	11.48	0.0019**
ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง A กับ C	1	0.225	0.225	0.14	0.7090ns
ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง B กับ C	1	0.625	0.625	0.39	0.5348ns
ปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่าง A กับ B กับ C	1	1.225	1.225	0.77	0.3863ns
ความคลาดเคลื่อน	32	50.8	1.5875		
รวม	39	74.775			

[1/] ปัจจัย A ตาจากต้นแม่พันธ์

A1= ต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกอายุ 4 ปี

A2= ต้นแม่พันธุ์ตอนกิ่งจากต้นในแปลงปลูกอายุ 8 ปี

ปัจจัย B ต้นแม่พันธุ์

B1= ต้นแม่พันธุ์ผลิตจากต้นในแปลงปลูกผ่านการตรวจเชื้อ,

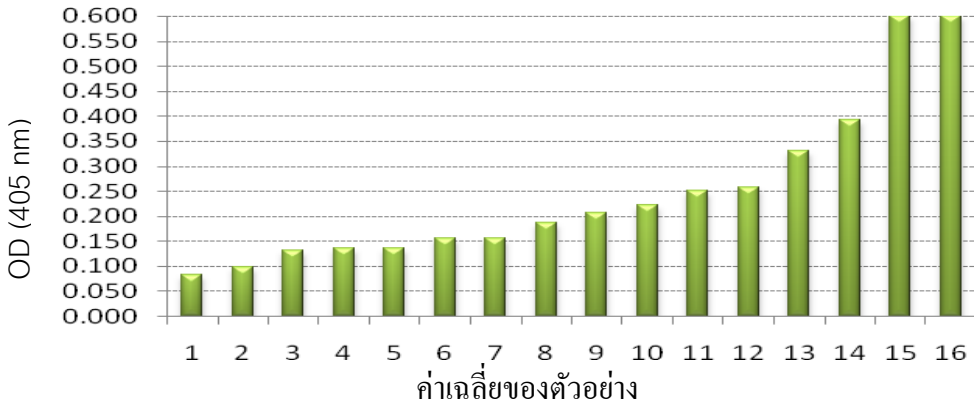
B2= ต้นแม่พันธุ์ผลิตจากต้นในแปลงปลูกไม่มีการตรวจเชื้อ

ปัจจัย C ชนิดของต้นตอ

C1= ส้มโอพันธุ์ทองดี C2= ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

[2/] ns = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 0.01

ภาคผนวก ค



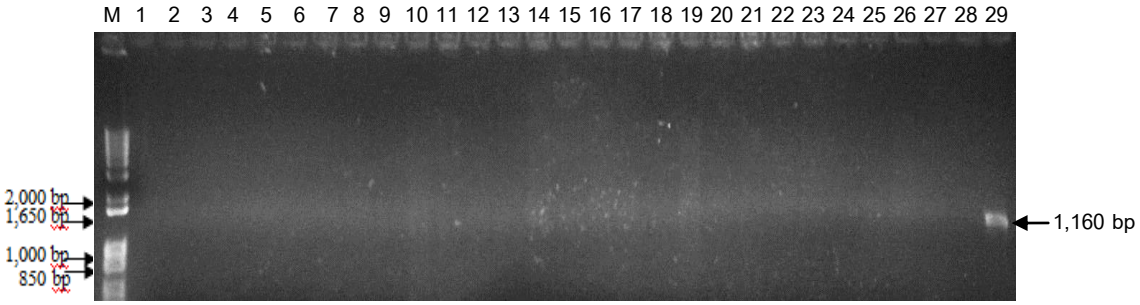
ภาพภาคผนวกที่ 1 คำนวณค่า cut-off ตามวิธีการของ Bioreba, (2011) วิเคราะห์ผลการติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาของต้นส้มโอในแปลงปลูก

Cut-off = (mean + 3s) X 10%

Mean: mean of the mean values up to step (mean values 1-12) = 0.151

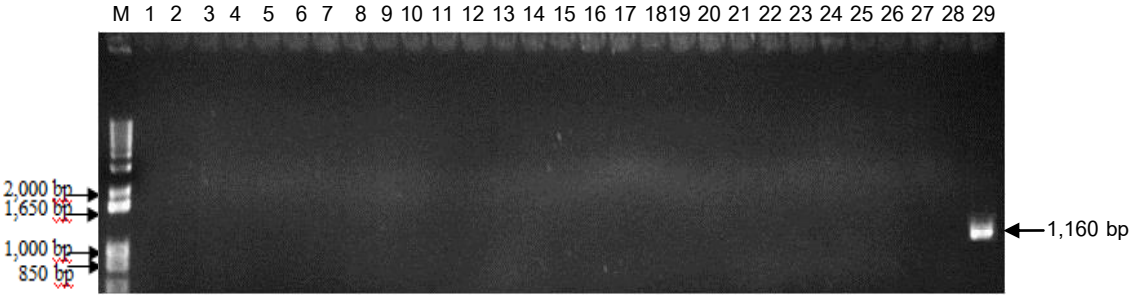
S: Standard deviation of mean values 1-12 = 0.044

Cut-off = (0.151+ (3 x 0.044)) x 0.6 = 0.169



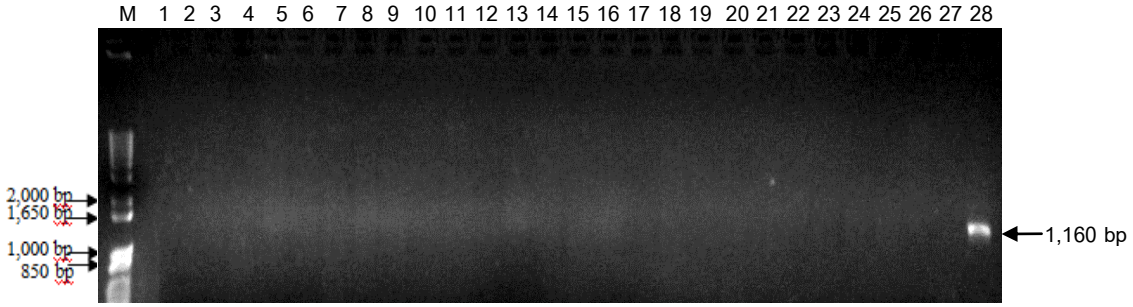
ภาพภาคผนวกที่ 2 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์โอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง	M	DNA Maker 1 kb
ช่องที่	1-26	ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ
ช่องที่	27	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	28	Deionized water
ช่องที่	29	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง



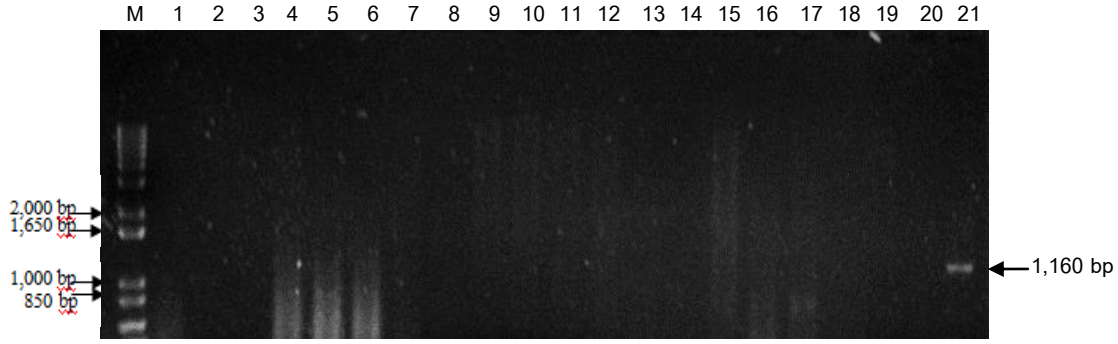
ภาพภาคผนวกที่ 3 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1-26	ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ
ช่องที่	27	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	28	Deionized water
ช่องที่	29	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง



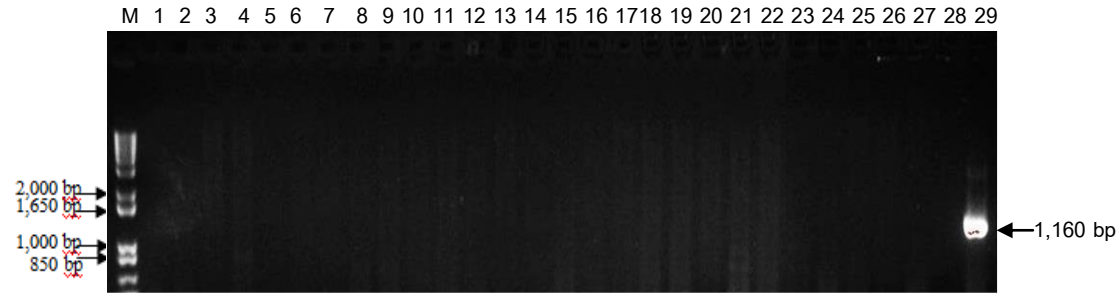
ภาพภาคผนวกที่ 4 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1-25	ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ
ช่องที่	26	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	27	Deionized water
ช่องที่	28	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง



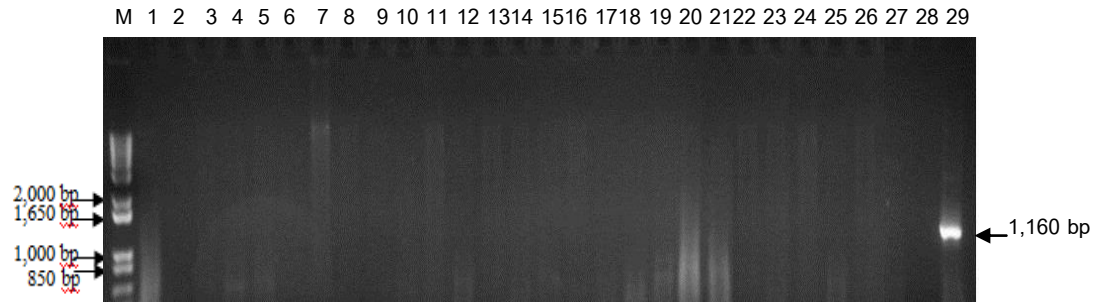
ภาพภาคผนวกที่ 5 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1-18	ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ
ช่องที่	19	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	20	Deionized water
ช่องที่	21	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง



ภาพภาคผนวกที่ 6 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง	M	ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่	1-26	ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ
ช่องที่	27	ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่	28	Deionized water
ช่องที่	29	ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



ภาพภาคผนวกที่ 7 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

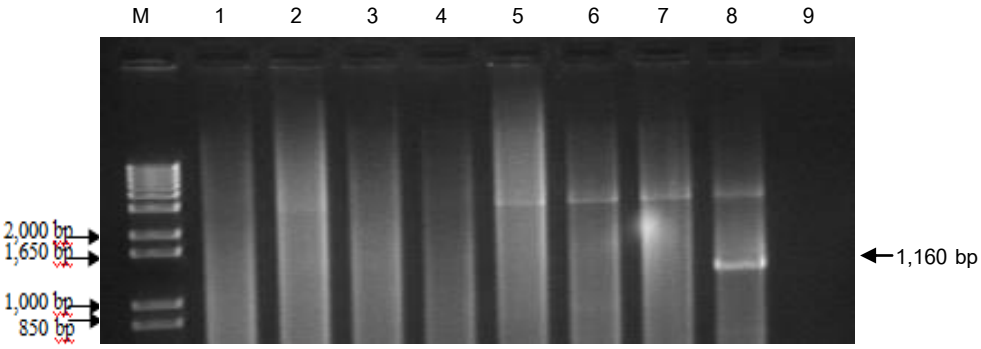
ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb

ช่องที่ 1-26 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ

ช่องที่ 27 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ

ช่องที่ 28 Deionized water

ช่องที่ 29 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



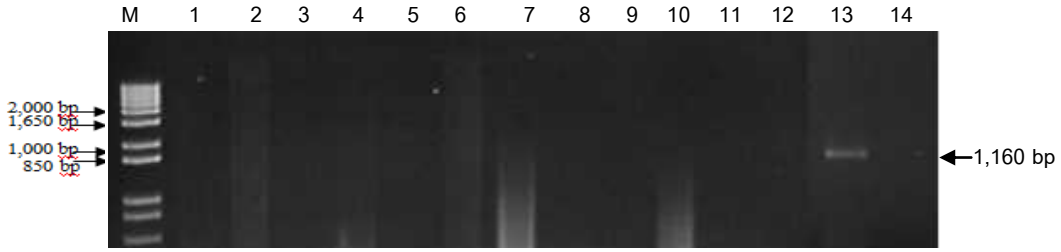
ภาพภาคผนวกที่ 8 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M DNA เปรียบเทียบขนาด 1 kb

ช่องที่ 1-7 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 4 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ

ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ

ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



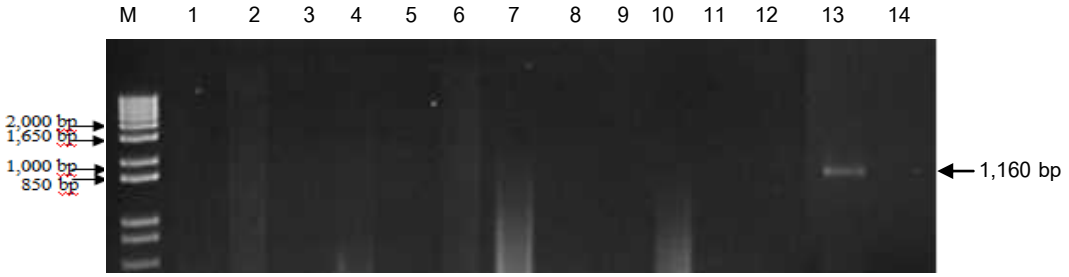
ภาพภาคผนวกที่ 9 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb

ช่องที่ 1-12 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ

ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

ช่องที่ 14 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ



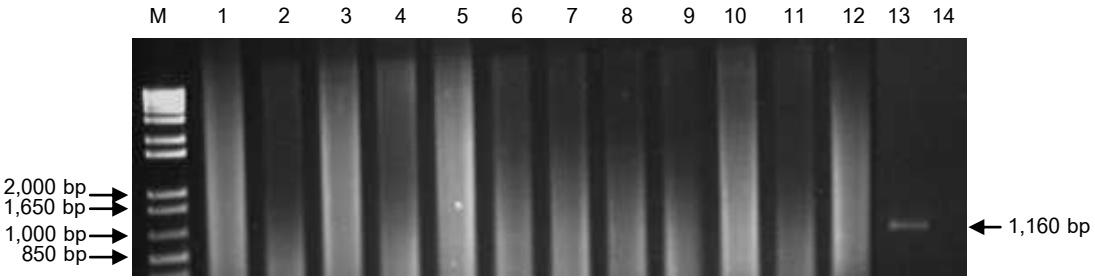
ภาพภาคผนวกที่ 10 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb

ช่องที่ 1-12 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ

ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

ช่องที่ 14 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ



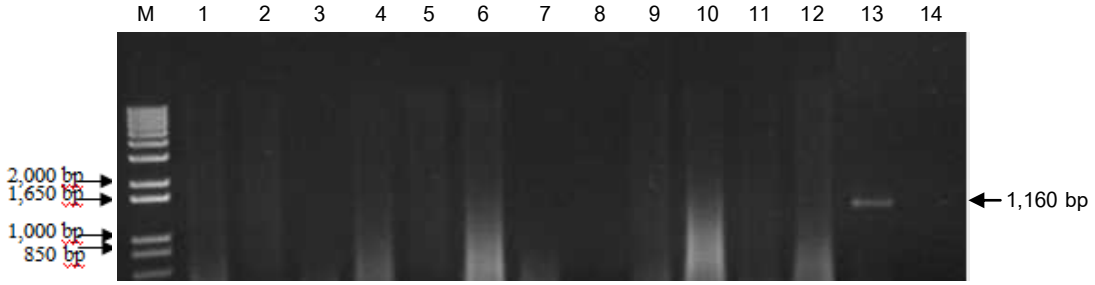
ภาพภาคผนวกที่ 11 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb

ช่องที่ 1-12 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ

ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

ช่องที่ 14 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ



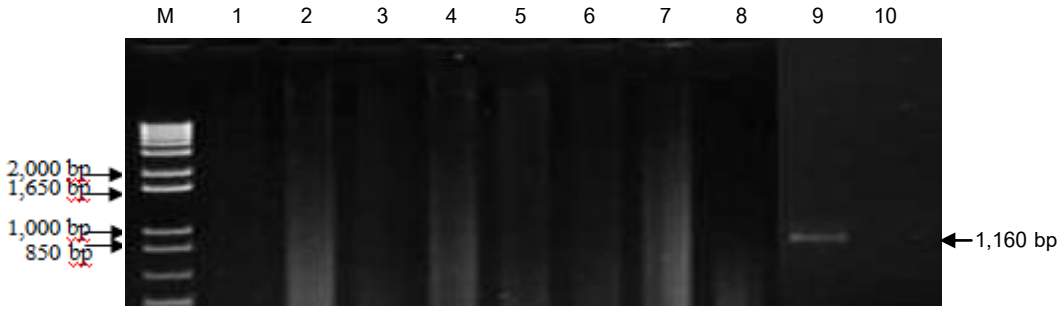
ภาพภาคผนวกที่ 12 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb

ช่องที่ 1-12 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์จากสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจโรค

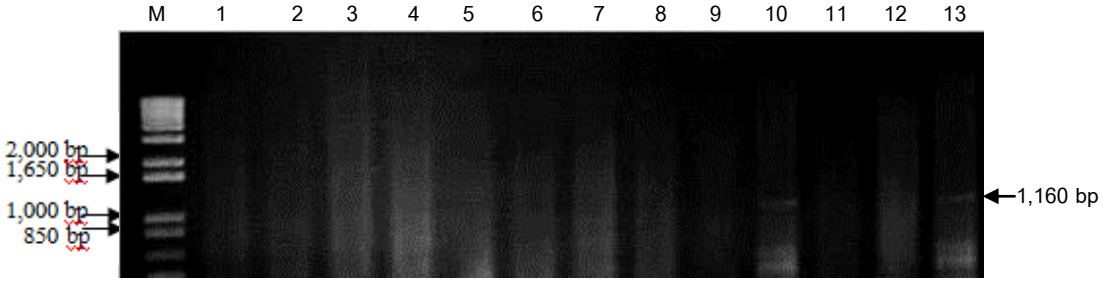
ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

ช่องที่ 14 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ



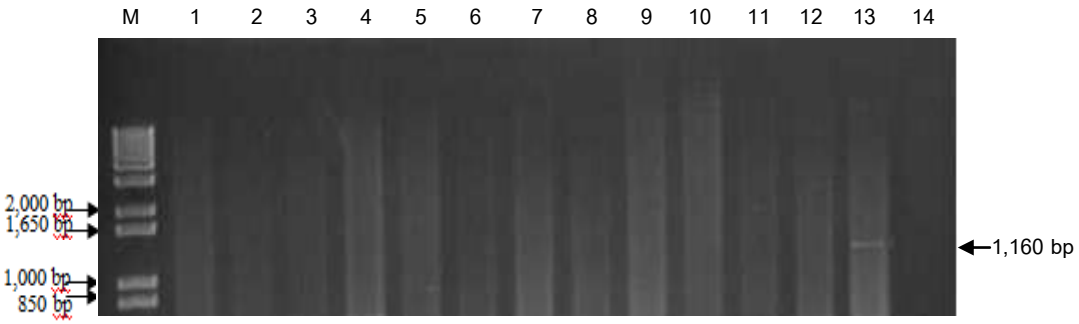
ภาพภาคผนวกที่ 13 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่ 1-8 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ผ่านการตรวจเชื้อ
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ



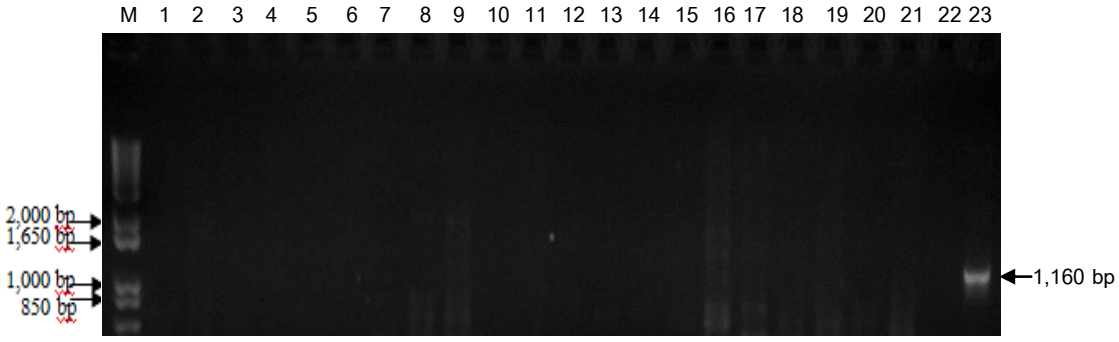
ภาพภาคผนวกที่ 14 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่ 1-11 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ
ช่องที่ 12 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง



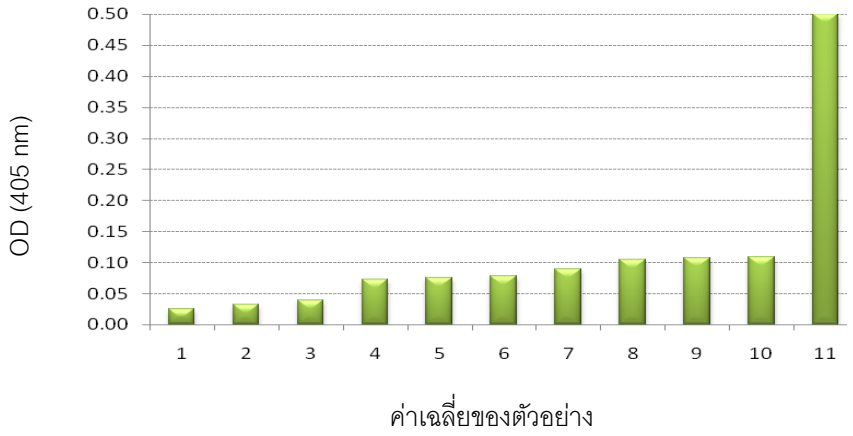
ภาพภาคผนวกที่ 15 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่ 1-12 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ
ช่องที่ 13 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง
ช่องที่ 14 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ



ภาพภาคผนวกที่ 16 ผลการตรวจสารพันธุกรรม (16S rRNA gene) ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคฮวงลองบิงโดยเทคนิคพีซีอาร์ในต้นแม่พันธุ์ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม

ช่อง M ดีเอ็นเอ Maker 1 kb
ช่องที่ 1-20 ดีเอ็นเอจากต้นแม่พันธุ์ที่ผลิตได้จากกิ่งตอนสวนที่มีอายุต้น 8 ปี ไม่มีการตรวจเชื้อ
ช่องที่ 21 ดีเอ็นเอจากส้มโอปกติ
ช่องที่ 22 Deionized water
ช่องที่ 23 ดีเอ็นเอจากส้มโอติดเชื้อฮวงลองบิง



ภาพภาคผนวกที่ 17 คำนวณค่า cut-off ตามวิธีการของ Bioreba, (2011) ในการวิเคราะห์ผลการติดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาของกิ่งพันธุ์ส้มโอที่ผลิตได้

Cut-off = (mean + 3s) X 10%

Mean: mean of the mean values up to step (mean values 1-10) = 0.073

S: Standard deviation of mean values 1-10 = 0.0314

Cut-off = (0.073 + (3 x 0.0314)) x 1.1 = 0.184

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวพิมพา พงศ์พัฒนบุตร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5310620031

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2553

ทุนการศึกษา

-ทุนโครงการทุนเรียนดี ประจำปีการศึกษา 2553 ระยะเวลาในการรับทุน 2 ปี ระหว่างภาคการศึกษาที่ 1 ปีการศึกษา 2553 ถึงภาคการศึกษาที่ 2 ปีการศึกษา 2554

-ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

พิมพา พงศ์พัฒนบุตร และรัตนา สดุดี. 2555. การผลิตต้นแม่พันธุ์ปลอดโรคของส้มโอ [*Citrus maxima* (Burm.) Merr.] พันธุ์ทับทิมสยามจากต้นในแปลงปลูก. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร 43(2)(พิเศษ) : 225-228.