รายงานการวิจัย

# การป้องกันกำจัดโรคต้นแห้งตายของพืชสกุลขนุน ( Artocarpus sp.) โดยวิธีบูรณภาพ

**Integrated control of die-back disease of Artocarpus sp.**

โดย


เสมอใจ ชื่นจิตต์

อนุชิต ชินาจริยวงศ์ ผู้ร่วมวิจัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิทยาเขตหาดใหญ่



Order Key 18636

BIB Key 156197

เลขหมู่ SB950.73.T52S66

เลขทะเบียน ศน 1541

- 2 เม.ย. 2542

# บทคัดย่อ

โรคต้นแห้งตายของจำปาดะขนุน Artocarpus sp. สำรวจพบครั้งแรกในปี 2532 ที่เกาะยอ จ.สงขลา ลักษณะที่ปรากฏภายนอกคือมียางสีขาวหรือสีน้ำตาลดำไหลออกจากเปลือกของกิ่งหรือลำต้นที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ใต้เปลือกปรากฏรอยแผลเป็นริ้วหรือบริเวณสีน้ำตาลมีรูปร่างไม่แน่นอน จากการศึกษาเนื้อเยื่อที่แสดงอาการโรค พบกลุ่มของแบคทีเรียจำนวนมากเข้าทำลายระหว่างเซลล์และภายในเซลล์ของท่ออาหาร แบคทีเรียที่ได้จากการแยกเชื้อบริสุทธิ์และพิสูจน์โรคแล้วเป็นพวกแกรมลบ ขนาด 0.72-0.78 x 2.9-4.7 ไมครอน มี peritrichous Flagella สามารถใช้กลูโคสได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่สามารถย่อย pectin จำแนกได้เป็น Erwinia nigrifluens ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกที่พบบนจำปาดะขนุน

จากการศึกษาประสิทธิภาพของปฏิชีวนสาร 3 ชนิดซึ่งได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Oxytetracycline, Streptomycin และ Dexan โดยวิธีฉีดเข้าลำต้น (trunk injection) พบว่า Oxytetracycline ที่ 2,500 ppm. ให้จำนวนต้นรอดตายสูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะต้นที่เชื้อเข้าทำลายในระยะแรก ต้นที่เป็นโรคแล้วแม้ไม่รอดตายแต่ทรุดโทรมมากเจ้าของมักโค่นทิ้ง เมื่อศึกษาการควบคุมโดยวิธีบูรณภาพพบว่าการใช้ปฏิชีวนสารควบคู่กับ Foli-R-Fos 400 ร่วมกับวิธีทางเขตกรรมคือ ให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 2 กิโลกรัมต่อต้น และตัดต้นเป็นโรคและเผาช่วยลดการระบาดของโรคได้

จากการสำรวจการระบาดของโรค สำรวจแมลงโดยวิธีกับดักแสงไฟ และการแยกเชื้อแบคทีเรียจากแมลง พบว่ามีการระบาดของโรคตลอดปีแต่รุนแรงมากในเดือนเมษายน ปี พ.ศ. 2534 และ ปี พ.ศ. 2535 โดยมีต้นแสดงอาการโรคถึง 24 และ 22 ต้นตามลำดับ แมลงที่พบเชื้อแบคทีเรียที่คล้ายคลึงกับ E. nigrifluens จากแมลงในวงศ์ต่างๆ ในอันดับ Coleoptera, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera และ Diptera ถึงอย่างไรก็ตามไม่สามารถหาความสัมพันธ์ระหว่างการระบาดของโรคกับปริมาณแมลงดังกล่าวข้างต้นได้

# Abstract

An undescribed bark canker disease of champedak jack-fruit (Artocarpus sp.) was first found at Ko Yo district, Songkhla province, Thailand and elsewhere, in 1989. It is characterized by white latex or dark-brown watery exudate on infected branches or trunks of mature trees. In the bark, irregular dark-brown necrotic areas or brown streaks are extensively formed. According to histological study of infected barks, a large number of bacteria were present in intercellular or intracellular space of phloem regions. A kind of bacteria was isolated and proved to be the causal organism. It is a gram-negative, peritrichous flagella, fermenting glucose anaerobically and non-pectolytic bactrium. By direct comparisons, the bark canker organism of champedak jack-fruit was identified as Erwinia nigrifluens and Artocarpus sp. is an additional host.

Oxytetracycline, Streptomycin and Dexan at the concentration of 2,500 ppm, which is the result from laboratory testing, was applied to the affected plants by means of trunk injection. It was evident that oxytetracycline effectively suppressed the die-back symptom 60 percent of treated plants survived but they still declined, so the owners cut and destroy. An attemp to control the disease, an integrated approach was conducted by applied the combination of antibiotics at the concentration of 2,500 ppm and Foli-R-Fos 400 (1:1) then applied 2 kg of 15-15-15 fertilizer and regularly destroyed (cut and burned) the infected plants.

Results from the disease incident study was found that the outbreak of the disease occured year round, particularly, in April 1991 and 1992 and number of trees showed the disease symptom were 24 and 22, respectively.

Insect monitoring from light traps to study the possibility of insect transmission was done. The causal agent isolations were performed from the caught insects. Some microorganisms which were similar to E. nigrifluens were found on insects in various families in the order Coleoptera, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera and Diptera. However, no relationship between the outbreak of the disease and number of insects was detected.

# สารบาญเรื่อง


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | (1) |
| บทคัดย่อ | (2) |
| Abstract | (3) |
| สารบาญเรื่อง | (4) |
| สารบาญตาราง | (5) |
| สารบาญรูป | (7) |
| สารบาญตารางผนวก | (8) |
| บทนำ | 1 |
| วัสดุและวิธีการ | 5 |
| ผลการทดลอง | 16 |
| สรุปและวิจารณ์ผล | 49 |
| เอกสารอ้างอิง | 57 |

# สารบาญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | ส่วนประกอบและปริมาณสารอาหารในสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ (หน่วยเป็นกรัม) | 13 |
| 2. | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อจากจำปาคะขนุนที่เป็นโรค เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสาเหตุโรคสกุลต่างๆ | 20 |
| 3. | ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อจากจำปาคะขนุนเปรียบเทียบกับ Erwinia nigrifluens , E. rubrifaciens, E. quercina, E. salicis และ E. carotovora var. carotovora | 21 |
| 4. | การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อที่แยกได้เปรียบเทียบกับ Erwinia nigrifluens, E. rubrifaciens, E. quercina, E. salicis และ E. carotovora var. carotovora | 22 |
| 5. | ความสามารถในการใช้สารประกอบอินทรีย์ของเชื้อจากจำปาคะขนุน 8 isolate เปรียบเทียบกับ Erwinia nigrifluens, E. rubrifacient, E. quercina, E. salicis และ E. carotovora var. c arotovora | 23 |
| 6. | ประสิทธิภาพของสารเคมี 4 ชนิดต่อเชื้อ Erwinia nigrifluens ในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 1) | 25 |
| 7. | ประสิทธิภาพของสารเคมี 5ชนิดต่อเชื้อ Erwinia nigrifluens ในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 2) | 27 |

ตารางที่ หน้า

8. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในแปลงของเกษตรกรครั้งที่ 2 31

9. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีร่วมกับ Foli-R-Fos 400 41

# สารบาญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | ขั้นตอนการฉีดสารเคมีเข้าในลำต้น | 8 |
| 2. | อาการของโรคต้นแห้งตายของจำปาดะขนุน | 17 |
| 3. | กลุ่มของแบคทีเรียที่พบในส่วนของ phloem fiber และ ray parenchyma (x 3,000) | 18 |
| 4. | การจัดอบรมให้ความรู้แก่เกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรฉีดสารเคมีต้นพืชที่เป็นโรค | 30 |
| 5. | เปรียบเทียบต้นที่เป็นโรคก่อนและหลังฉีดสารเคมี 2 เดือน | 33 |
| 6. | การเพาะเลี้ยงปลายยอดจำปาดะขนุนในอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 0.25% | 33 |
| 7. | E. nigrifluens บนอาหาร EMB Mod.1-12, NA และ MS | 35 |
| 8. | จำนวนต้นจำปาดะขนุนสวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ ที่แสดงอาการโรคต้นแห้งตาย ตั้งแต่มกราคม 2533 ถึง ธันวาคม 2535 | 37 |
| 9. | จำนวนต้นตายของจำปาดะขนุน สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ เนื่องจากโรคแห้งตาย ตั้งแต่มกราคม 2533 ถึง ธันวาคม 2535 | 37 |
| 10. | ต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย และสภาพสวนที่เปลี่ยนแปลง | 48 |

# สารบาญตารางผนวก


| ตารางผนวกที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | จำนวนและขนาดของโคโลนีของเชื้อ Erwinia nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 60 |
| 2. | ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Erwinia nigrifluens บนอาหารสูตรต่างๆ | 61 |
| 3. | วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโคโลนีของเชื้อ Erwinia nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 61 |
| 4. | วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโคโลนี (มม.) ของเชื้อ Erwinia nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 62 |
| 5. | เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีของเชื้อ Erwinia nigrifluens ที่พิสูจน์แล้ว และที่แยกจากดิน บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 62 |
| 6. | เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดโคโลนี(มม.).ของเชื้อ Erwinia nigrifluens ที่พิสูจน์แล้ว และที่แยกจากดิน บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 63 |
| 7. | วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโคโลนีของเชื้อ Erwinia nigrifluens จากตัวอย่างดินที่คลุกด้วยชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 63 |
| 8. | วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโคโลนี (มม.) ของเชื้อ Erwinia nigrifluens จากตัวอย่างดินที่คลุกด้วยชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด | 64 |

# บทนำ

จำปาดะขนุนเป็นไม้ผลลูกผสมระหว่างจำปาดะและขนุน มีรูปร่างคล้ายขนุน หนาม เล็กถี่ เนื้อและกลิ่นเหมือนจำปาดะ รสชาดดี กลิ่นไม่ฉุนจนเกินไป เนื้อนิ่มไม่เละเหมือน จำปาดะพันธุ์พื้นเมือง เป็นที่ยอมรับกันว่า จำปาดะขนุนเป็นผลไม้ที่มีคุณภาพดีมาก จึงเป็นที่นิยมบริโภคทั่วไปในภาคใต้ จำปาดะขนุนนี้นำมาจากที่ใดไม่ปรากฏแน่ชัด แต่มาเผยแพร่และปลูกกันอย่างแพร่หลายที่ ต.เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา มีพื้นที่ปลูกทั้งสิ้น 300 ไร่ (สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา, เอกสารประกอบการประชุม) ส่วนในท้องที่อื่นยังไม่มีการรวบรวมไว้ โดยทั่วไปแล้วจำปาดะขนุนที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่จะให้ผลผลิตตลอดปี ประมาณ 100-150 ผลต่อต้น ขนาดผลใหญ่ มีน้ำหนักผลโดยเฉลี่ย 2.5 กิโลกรัม ราคาค่อนข้างสูง (15-70 บาท/ผล) ขึ้นอยู่กับขนาดของผล และฤดูกาล เจ้าของสวนกล่าวว่าสามารถจำหน่ายได้ผลละ 20 บาท เป็นราคาต่ำสุด จะเห็นได้ว่าเกษตรกรมีรายได้อย่างต่ำ 2,000-3,000 บาท/ต้น/ปี (40,000-60,000 บาท/ไร่/ปี) ซึ่งนับเป็นรายได้หลักของเกษตรกรกลุ่มนี้

ขณะนี้ เกษตรกรกำลังประสบปัญหารุนแรงเนื่องจากต้นจำปาดะขนุนแห้งตาย โดยหาสาเหตุไม่ได้ อาการที่สังเกตพบคือ มียางสีน้ำตาลอมส้มออกจากเปลือกของกิ่งหรือลำต้น ใบจะเปลี่ยนเป็นสีส้มและร่วง ผลร่วง กิ่งและลำต้นแห้งตาย (ภาพที่ 1) อาการดังกล่าวพบกับต้นที่มีอายุตั้งแต่ 6-100 ปี ซึ่งเป็นช่วงที่กำลังให้ผลผลิต ทำให้ต้นที่เป็นโรคไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ ปัญหานี้กลุ่มเกษตรกร ต.เกาะยอ ได้ขอความร่วมมือไปยังหน่วยราชการต่างๆ ขณะนี้จำปาดะขนุนตายไปแล้วเป็นจำนวนมาก จึงได้ไปสำรวจ พบว่าต้นที่แสดงอาการโรคแต่ยังไม่ตายมีจำนวนไม่น้อย จากการสำรวจของผู้วิจัย พื้นที่ปลูกจำปาดะขนุนของนายกริ้ม สินธุรัตน์ ในปี พ.ศ.2532-2533 จากพื้นที่ 5.5 ไร่ ปลูกพืชนี้จำนวน 125ต้น ตายไปด้วยอาการของโรคดังกล่าวข้างต้นจำนวน 20 ต้น เป็นโรคที่ไม่ตายจำนวน 32 ต้น และต้นที่แสดงอาการเริ่มแรก 3 ต้น รวมต้นที่เป็นโรค 55 ต้น คิดเป็น 44 % ของต้นทั้งหมด ต้นที่ไม่ตายก็ไม่สามารถให้ผลผลิตได้เนื่องจากมีใบเหลือ 5-15 % บางต้นใบเหลืองหรือเขียวหม่น ไม่สมบูรณ์ หากได้รับการบำรุงดูแลอย่างดีต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 3 ปีจึงจะให้ผลผลิตดังเดิม จึงเห็นว่าปัญหานี้มีความเสียหายต่อเกษตรกรเจ้าของสวนและต่อเศรษฐกิจส่วนรวม ของ อ.เมือง จ.สงขลา เป็นอย่างยิ่ง

นอกเหนือจากที่พบในจำปาดะขนุนแล้ว ได้สำรวจพบโรคนี้ในขนุน และจำปาดะพื้นเมืองอีกด้วย เกษตรกรพบว่าโรคนี้ระบาดรุนแรงที่ อ.ควนขนุน จ.พัทลุง และอ.นาทวี จ.สงขลา ซึ่งพบว่าเชื้อโรคเข้าทำลายถึง 91 % และ 54% ตามลำดับ นายแดง แสงแก้ว เจ้าของสวนที่

จ.พัทลุง กล่าวว่า ตั้งแต่ปี 2530 เป็นต้นมาขนุนแห้งตายโดยไม่สามารถทราบสาเหตุด้วยอาการคล้ายคลึงกับที่กล่าวมาข้างต้น ส่วนที่ อ. นาทวี จ.สงขลา นั้นพื้นที่และจำนวนปลูกมีไม่มากนัก ปลูกขนุนพันธุ์ดีชื่อพันธุ์ทองนาทวี ซึ่งมีขวงใหญ่ ยาว เนื้อหนา หวานกรอบ รสชาดดีผลใหญ่ มากน้ำหนักต่อผล ประมาณ 40-50 กก. ผลผลิตสูงสุดที่เคยได้คือ 82 กก. /ผล เป็นพันธุ์ที่มีชื่อเสียง (บุญส่ง ,2531) ในขณะที่ผู้วิจัยไปสำรวจมีขนุน 3 ต้น ที่แสดงอาการชัดเจนว่าเป็นโรคในระยะเริ่มแรกคือ มียางสีขาวไหลจากเปลือกเมื่อใช้มีดถากดูส่วนของ cambium พบว่าเป็นริ้วสีน้ำตาล แต่ใบยังไม่ร่วง เกษตรกรไม่ทราบว่าเป็นโรค ยังคงใช้ยอดจากต้นที่เป็นโรคนั้นขยายพันธุ์ต่อไป จึงเป็นที่น่าวิตกว่าการขยายพันธุ์จากต้นที่เป็นโรค อาจเป็นการแพร่โรคนี้ไปยังท้องที่ต่างๆ ได้ สำหรับสาเหตุของโรคนั้น เสมอใจและคณะ(2532) ได้ทำการศึกษาทางราวิทยา วิสาวิทยา แบคทีเรียวิทยาและไส้เดือนฝอยวิทยาประกอบกับการวินิจฉัยอื่นๆ พบว่าสาเหตุของโรคคือ เชื้อแบคทีเรียในสกุล Erwinia ในต่างประเทศมีรายงานโรคที่คล้ายคลึงกับที่พบในจำปาดะขนุน คือโรค bark canker และ phloem canker ใน walnut ซึ่งเกิดจากเชื้อ Erwinia nigrifluens (Wilson et al.,1957)และ E. rubrifaciens (Wilson et al., 1967 ) ตามลำดับ

นอกจากนี้ Lim และ Yasin (1983) รายงานพบโรค branch die-back บนขนุน (A. heterophyllus) และจำปาดะ (A. integer) โรคดังกล่าวทำความเสียหายให้กับขนุนในประเทศมาเลเซียเป็นพื้นที่ถึง 20 เฮกแตร์ จากพื้นที่ปลูก 50 เฮกแตร์ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี Lim (1986) พบว่าเชื้อ Erwinia carotovora var. carotovora เป็นสาเหตุของโรค

สำหรับการแพร่ระบาดของโรค Dye (1968) ได้กล่าวถึงการถ่ายทอดและการแพร่ระบาดของโรคซึ่งเกิดจากเชื้อในกลุ่ม Erwinia amylovora ว่าสามารถแพร่ระบาดได้หลายทาง โดยอาจแพร่ระบาดได้จากของเหลวที่ถูกดันจากต้นพืชที่เป็นโรค (bacterial ooze) และอาจติดไปกับเครื่องมือเครื่องใช้ในการตัดแต่งกิ่ง ส่วน Marshall และคณะ (1941) รายงานว่า เพลี้ยกระโดด (leafhoppers ) สามารถเป็นพาหะโรคถ่ายทอดโรค fire blight ของแอบเปิ้ล และแพร่ได้

ในขณะที่ Schaad และWilson (1970) รายงานว่า Erwinia rubrifaciens ซึ่งเป็นสาเหตุโรค bacterial phloem canker ของ Persian walnut สามารถถ่ายทอดและแพร่ระบาดได้ด้วยน้ำฝน เนื่องจากฝนสามารถชะล้างแบคทีเรียที่อยู่บริเวณแผลของต้นที่เป็นโรคลงสู่ดิน และ

สามารถมีชีวิตอยู่ในดินได้อย่างน้อย 90 วันในฤดูหนาว นอกจากนั้นน้ำฝนที่ถูกชะจะไหลไปทำให้โรคแพร่ไปยังต้นปกติได้ เสมอใจ และคณะ (2532) รายงานว่าต้นที่เป็นโรคพบกระจายทั่วไปในสวนทั้งนี้อาจมีแมลงเป็นพาหะ

วิธีพื้นฐานทั่วไปที่ใช้ในตรวจการหาเชื้อแบคทีเรียที่ติดมากับแมลง คือการนำแมลงที่สงสัย มาบดขยี้หรือแยกอวัยวะเป็นส่วนๆ จากนั้น streak บนอาหารที่เหมาะสม Wilson และคณะ(1957) และ Dye (1968) รายงานเกี่ยวกับเชื้อ E. nigrifluens ว่าสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YDC และ PGA ได้ดี โดยมีโคโลนีสีขาว กลม ผิวหน้ากลมนูนเป็นมัน ไม่มี pigment และสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB มีโคโลนีสีม่วง พร้อมกับสร้าง metallic sheen ซึ่งแตกต่างจากเชื้อชนิดอื่น

Wilson และ คณะ (1957) รายงานว่า เมื่อนำเชื้อที่ทำให้เกิดโรค bark canker ซึ่งเกิดจากเชื้อ E. nigrifluens ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bacto EMB agar ที่ประกอบด้วย eosin-methylene blue sucrose และ lactose โคโลนีที่ได้จะมีสีม่วงเข้ม และ greenish metallic sheen ส่วนในอาหาร EMB ที่ประกอบด้วย lactose เพียงอย่างเดียว โดยไม่มีน้ำตาล sucrose จะได้โคโลนีสีชมพู Wilson และคณะ(1967) รายงานว่าอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์ Escherichia coli ซึ่งอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่รู้จักกันคือ EMB ซึ่งประกอบด้วย peptone , sucrose, lactose, eosin Y และ methylene blue ในอาหารนี้โคโลนีของ E. coli สร้าง greenish metallic sheen และกล่าวว่าการเกิดขึ้นของ metallic sheen นั้นจะเกิดในสภาพที่เป็นกรด และกรดที่สร้างขึ้นก็เป็นปัจจัยของแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ fructose และ glycerol อีกทั้งยังใช้

$(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งของไนโตรเจนแทนการใช้ peptone อีกด้วย ดังนั้นในการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อใช้ในการแยกเชื้อจากแมลงจึงใช้ EMB agar เป็นอาหารพื้นฐาน

สำหรับการป้องกันและกำจัดโรคนี้ยังไม่มีรายงาน Beutal และคณะ (1983) ได้รายงานถึงการควบคุมโรค fire blight ซึ่งเกิดจากเชื้อ E. amylovora และมีอาการคล้ายคลึงกับโรคนี้ว่าควรใช้สารประกอบทองแดง (copper fungicide) ฉีดพ่นต้นที่เป็นโรค หรือใช้ปฏิชีวนสารเช่น Streptomycin ส่วน Lim (1986)ซึ่งรายงานว่า E. carotovora var carotovora เป็นสาเหตุของโรคกิ่งแห้งตาย ของขนุน แนะนำให้ใช้ Terramycin ที่มีความเข้มข้น 1,600 ppm. จำนวน 1 ลิตร ฉีดเข้าลำต้นขนุนที่แสดงอาการโรคในระยะแรก หากเข้าทำลายรุนแรงจะไม่ได้

ผล ควรตัดทิ้งทันที และในกรณีที่ปลูกใหม่ ควรปลูกพืชอื่นที่ไม่ใช่เป็นพืชอาศัยของเชื้อชนิดนี้เช่น ทุเรียน โดยปลูกแซมในลักษณะ intercropping จะช่วยลดการระบาดของโรคได้ และควรดูแลต้นพืชให้สมบูรณ์

สาร Foli-R-Fos 400 มีชื่อสามัญว่า phosphoric acid มีคุณสมบัติที่ดีในการกำจัดเชื้อราชั้นต่ำ เช่น Phytophthora การทรีตยากับต้นพืชสามารถกระทำได้หลายรูปแบบ ทั้งราดลงดินหรือฉีดเข้าลำต้น สารนี้มีสูตรโครงสร้างไม่ใหญ่ เมื่อฉีดเข้าลำต้นจะเคลื่อนตามแนวท่อน้ำ (xylem) ขึ้นสู่ส่วนยอด จากนั้นเคลื่อนย้ายลงตามท่ออาหาร (phloem) โดยอาศัยพลังงาน การสะสมอาหาร และปะปนไปกับสารที่ได้จากการสังเคราะห์แสง กระจายทั่วต้น เมื่อสลายตัวมีคุณสมบัติให้ธาตุฟอสฟอรัส และช่วยให้พืชแข็งแรง ต้านทานโรคได้ในการทดลองเพื่อควบคุมโรคแห้งตายของพืชสกุลขนุนนี้ จึงได้ศึกษาแนวทางต่างๆ เช่นการใช้สารเคมีกำจัดแบคทีเรีย การเพิ่มความแข็งแรงให้กับพืชเพื่อความต้านทานเชื้อ การหาสายพันธุ์ที่ต้านทาน รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดโรคโดยแมลง เพื่อแก้ปัญหาระยะยาว และเพื่อผลประโยชน์ต่อเกษตรกรโดยตรง

สถานที่ทำการทดลอง : ห้องปฏิบัติการและแปลงทดลองภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
: สวนเกษตรกรนายกริ้ม สินธุรัตน์ หมู่ 3 ต. เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา
: สวนเกษตรกรนายเดชา ภัทรชนม์ หมู่ 4 ต.เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา
: สวนเกษตรกรอื่นๆ ใน ต.เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา
: สวนเกษตรกรนายอดุลย์ เตะมาหมัด อ.นาทวี จ.สงขลา

ระยะเวลาในการทดลอง : ตุลาคม 2534-ตุลาคม 2541

# อุปกรณ์และวิธีการ

## 1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคจากต้นจำปาดะขนุน ที่เป็นโรคมาทำการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 70% ตัดเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ แช่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในเนื้อเยื่อไหลออกมา ได้เป็น bacterial suspension นำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี direct streak และ dilution plate บนอาหาร NA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนี (colony) ที่มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร สีขาวโปร่งแสง ผิวหน้านูนเล็กน้อย ขอบเรียบ นำไป streak บน PSA slant (potato semi-synthetic agar) บ่มทิ้งไว้อีก 24 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก PSA slant ใส่น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร/ลูป เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป จากเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้นำไปศึกษาการจัดเรียงตัวของเซลล์ วัดขนาดและตรวจนับ flagella ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน (transmission)

## 2. ศึกษาตรวจดูกลุ่มของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช

ทำการศึกษากลุ่มของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยวิธีซึ่งดัดแปลงจาก อุไรวรรณ (2527) โดยตัดเนื้อเยื่อส่วนที่เป็นโรคเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5 x 1 มิลลิเมตร แช่ใน 4% glutaraldehyde ซึ่งเป็น fixing solution เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำมา dehydrate ด้วย acetone series ที่ 50%, 75%, 90%, 95%, และ 100% ตามลำดับขั้นตอนละ 30 นาที ทำให้แห้งด้วยวิธี critical point drying แล้วจึงเคลือบด้วยโลหะ ในที่นี้ใช้ไอคาร์บอนและทอง จากนั้นนำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดบันทึกภาพ

## 3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของแบคที เรีย

ทำการปลูกเชื้อบนต้นกล้าจำปาดะขนุนอายุ 3 เดือน และต้นที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่อายุประมาณ 12 ปีด้วยวิธีทำแผล (pin pricking) ที่ซอกกิ่งลำต้น และที่กิ่งหรือกิ่งใหญ่ ตามลำดับทำการทดลอง 40 จุด ด้วยเชื้อที่มีความเข้มข้น 2.2 x $10^6$ เซลล์/มล. รักษาความชื้นโดยคลุม

หรือปิดบริเวณที่ปลูกเชื้อไว้ด้วยถุงพลาสติก ตรวจผลทุกสัปดาห์ โดยถากเปลือกตรงจุดที่มีการปลูกเชื้อเพื่อดูการขยายตัวของแผล

**4. การจัดจำแนกชนิดของเชื้อ**

4.1 การทดสอบจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ genus: โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรี รวิทยา และชีวเคมี ตามวิธีที่กล่าวถึงใน Schaad (1986) โดยนำเชื้อจาก stock solution มาศึกษา gram reaction, การสร้างสปอร์ ลักษณะและสีของโคโลนี บน YDC การสร้างสารเรืองแสงบน KB medium การใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจน การเคลื่อนที่โดย flagella แบบรอบตัว(peritrichous) การเจริญบน D-1 agar, การเจริญบน MS medium และการสร้างเส้นใย

4.2 การทดสอบจำแนกชนิดของเชื้อในระดับ species

4.2.1 การศึกษาคุณสมบัติต่างๆ: โดยศึกษาและเปรียบเทียบดัดแปลงจาก Fahy และ Persley (1983) และ Schaad (1986) ทำการทดสอบปฏิกิริยา hypersensitivity บนใบยาสูบ การย่อย pectate ที่ pH 4.5-4.7, 6.9-7.1 และ 8.3-8.5 ตามวิธีของ Hildebrand ศึกษาความต้องการ growth factorsในการเจริญเติบโต, การสร้างเม็ดสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YDC, การเจริญที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส การสร้าง $H_2S$ จากสาร cysteine การสร้างเอนไซม์ urease การสร้างสาร indole การใช้ nitrate การใช้ gelatin และการเคลื่อนที่ในอาหาร

4.2.2 ศึกษาการสร้างกรดจาก C-source และสารใกล้เคียง ในการศึกษานี้ทำการปลูกเชื้อโดยการ streak เชื้อลงบนอาหารพื้นฐาน (Dye, 1968) ซึ่งเติม C-source จำนวน 18 ชนิด ได้แก่ adonitol, aesculin, cellobiose, dulcitol, glycerol, inositol, lactose, mannitol, melibiose, alpha methylglucoside, raffinose, rhamnose, ribose, salicin, sorbitol, starch, trehalose และ xylose ในอัตราความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.5 %(w/v) บันทึกผลทุกวันเป็นเวลา 1 สัปดาห์

4.2.3 ทดสอบความสามารถในการใช้สารพวกสารประกอบอินทรีย์ ในการศึกษานี้ ทำการปลูกเชื้อโดยการ streak เชื้อลงบนอาหารพื้นฐาน OY (Dye, 1968) ซึ่งเติมสารประกอบอินทรีย์ 3 ชนิดคือ sodium citrate, sodium tartrate และ sodium galacturonate ในอัตราความเข้มข้นเท่ากันคือ 0.5%(w/v) เปรียบเทียบความสามารถในการใช้สารเหล่านี้หลังทำการเลี้ยง 1 สัปดาห์ จนถึง 3 สัปดาห์

**5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 1)**

ทำการทดสอบโดยใช้ปฏิชีวนสาร (antibiotics) 4 ชนิดได้แก่ Streptomycin, Chloramphenical, Tetracycline และ Dexan โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ ด้วยวิธี zonal inhibition เตรียมอาหารผสมเชื้อ (bacterial lawn) โดยหลอมอาหาร NA และอุ่นไว้ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 53 องศาเซลเซียส ดูดเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่ 28 องศาเซลเซียส จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารที่หลอม และปล่อยไว้ให้อุ่น ปั่นด้วย vertex mixture เทลงใน plate ปล่อยให้อาหารแห้ง ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นจึงใช้ปากคีบ คีบ paper disc(Whatman filter paper เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.55 เซนติเมตร) จุ่มในสารเคมีแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 1,500 ppm.ที่เตรียมไว้ แล้วทำให้สะเด็ดโดยแตะที่ขอบภาชนะ วางบนอาหารผสมเชื้อ โดยวางจานละ 3 ชิ้น (3 ซ้ำ) และใช้น้ำเป็นชุดควบคุม (control) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (zone of inhibition)

**6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในสวนเกษตรกร (ครั้งที่ 1)**

เนื่องจากโรคนี้เกิดกระจัดกระจายในหลายๆสวน ในขั้นแรกได้ทำการให้หมายเลขแก่ต้นจำปาดะขนุนในแต่ละสวน เลือกต้นที่จะทำการทดลอง แล้วทำการ สุ่มชนิดของสารเคมีที่จะใช้ ทรีตกับต้นเหล่านี้ สารเคมีที่ใช้ได้แก่ Dexan, Streptomycline และ Tetracycline ความเข้มข้น 1,000 ppm. เลือกใช้ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากอาจจะเกิดเป็นพิษกับพืช (phytotoxic) สวนที่มีการทำการทดลองมี 4 สวน คือสวนของ นายกริ้ม สิมธุรัตน์ สวนนายเดชา ภัทรชนม์ สวนนายไพโรจน์ (ไม่ทราบนามสกุล) และสวนนายฮวดเห้ง กาลานุสนธิ์

ทำการทดลองด้วยวิธีการ trunk injection โดยดัดแปลงจาก เทคนิคโรคพืช มก.(ธรรมศักดิ์ 2532) อุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ สว่านมือพร้อมดอกสว่านขนาด 15/64 นิ้ว ฆ้อนและเข็มฉีดยาชนิดเดียวกันกับที่ใช้กับมนุษย์และสัตว์ แต่นำมาดัดแปลงให้เหมาะสม ตัดปลายเข็มและปลอกเข็มให้เข็มสั้นกว่าปลอกเข็มประมาณ 0.5 เซ็นติเมตร เตรียมกระบอกฉีด โดยตัดปลายที่กดก้านฉีด และกระบอกฉีดเพื่อเป็นที่ยึดของสายยางอัดความดัน แล้วใช้สายยางวงเล็ก 3 วง ผูกกัน 3 ต่อ รวม 9 วง เพื่อเป็นตัวอัดความดัน สำหรับการฉีดนั้น ใช้สว่านพร้อมดอกขนาด 15/64 นิ้ว เจาะตรงลำต้นลึก 2-3 เซนติเมตร เอียงทำมุม 45° กับลำต้น ตอกปลอกเข็มลงในรูเจาะลึก

**5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 1)**

ทำการทดสอบโดยใช้ปฏิชีวนสาร (antibiotics) 4 ชนิดได้แก่ Streptomycin, Chloramphenical, Tetracycline และ Dexan โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ ด้วยวิธี zonal inhibition เตรียมอาหารผสมเชื้อ (bacterial lawn) โดยหลอมอาหาร NA และอุ่นไว้ใน water bath อุณหภูมิประมาณ 53 องศาเซลเซียส ดูดเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลวที่ 28 องศาเซลเซียส จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารที่หลอม และปล่อยไว้ให้อุ่น ปั่นด้วย vertex mixture เทลงใน plate ปล่อยให้อาหารแห้ง ประมาณ 15-30 นาที จากนั้นจึงใช้ปากคีบ คีบ paper disc(Whatman filter paper เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.55 เซนติเมตร) จุ่มในสารเคมีแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 500, 1,000 และ 1,500 ppm.ที่เตรียมไว้ แล้วทำให้สะเด็ดโดยแตะที่ขอบภาชนะ วางบนอาหารผสมเชื้อ โดยวางจานละ 3 ชิ้น (3 ซ้ำ) และใช้น้ำเป็นชุดควบคุม (control) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (zone of inhibition)

**6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในสวนเกษตรกร (ครั้งที่ 1)**

เนื่องจากโรคนี้เกิดกระจัดกระจายในหลายๆสวน ในขั้นแรกได้ทำการให้หมายเลขแก่ต้นจำปาดะขนุนในแต่ละสวน เลือกต้นที่จะทำการทดลอง แล้วทำการ สุ่มชนิดของสารเคมีที่จะใช้ ทรีตกับต้นเหล่านี้ สารเคมีที่ใช้ได้แก่ Dexan, Streptomycline และ Tetracycline ความเข้มข้น 1,000 ppm. เลือกใช้ความเข้มข้นต่ำ เนื่องจากอาจจะเกิดเป็นพิษกับพืช (phytotoxic) สวนที่มีการทำการทดลองมี 4 สวน คือสวนของ นายกริ้ม สิมธุรัตน์ สวนนายเดชา ภัทรชนม์ สวนนายไพโรจน์ (ไม่ทราบนามสกุล) และสวนนายฮวดเห้ง กาลานุสนธิ์

ทำการทดลองด้วยวิธีการ trunk injection โดยดัดแปลงจาก เทคนิคโรคพืช มก.(ธรรมศักดิ์ 2532) อุปกรณ์ที่ใช้ได้แก่ สว่านมือพร้อมดอกสว่านขนาด 15/64 นิ้ว ฆ้อนและเข็มฉีดยาชนิดเดียวกันกับที่ใช้กับมนุษย์และสัตว์ แต่นำมาดัดแปลงให้เหมาะสม ตัดปลายเข็มและปลอกเข็มให้เข็มสั้นกว่าปลอกเข็มประมาณ 0.5 เซ็นติเมตร เตรียมกระบอกฉีด โดยตัดปลายที่กดก้านฉีด และกระบอกฉีดเพื่อเป็นที่ยึดของสายยางอัดความดัน แล้วใช้สายยางวงเล็ก 3 วง ผูกกัน 3 ต่อ รวม 9 วง เพื่อเป็นตัวอัดความดัน สำหรับการฉีดนั้น ใช้สว่านพร้อมดอกขนาด 15/64 นิ้ว เจาะตรงลำต้นลึก 2-3 เซนติเมตร เอียงทำมุม 45° กับลำต้น ตอกปลอกเข็มลงในรูเจาะลึก

ประมาณ8 1 เซ็นติเมตร จากนั้นใช้หลอดฉีดยาดูดยา 40 มิลลิลิตร ต่อหลอด แล้วใช้เข็มสอดเข้ากับปลายกระบอกฉีดที่ดูดน้ำยาเข้าไปแล้ว นำไปต่อกับปลอกเข็มที่ตอกไว้ที่ลำต้นกดให้แน่น (รูปที่ 1) ทำการฉีด 2 หลอด รวม 80 มิลลิลิตร/ต้น ปล่อยให้น้ำยาเข้าต้นจนหมดแล้ว ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมงดึงเข็มออกแล้วใช้ปูนแดง ปิดที่แผล จากนั้นสังเกตและบันทึกลักษณะอาการทุกสัปดาห์ โดยดูจากการที่เชื้อไม่ลุกลามต่อไป หรือการแตกใบใหม่ของต้นที่ทรีตยาหรือต้นพืชตาย พร้อมทั้งบันทึกภาพ

รูปที่ 1 ขั้นตอนการฉีดสารเคมีเข้าในลำต้น

ก. เจาะลำต้นด้วยสว่านลึก 1.5 เซ็นติเมตร

ข. เขี่ยขุยไม้ออก

ค. ตอกปลอกพลาสติกที่ตัดแล้วให้ลึกประมาณ 1 เซ็นติเมตร

ง. กระบอกฉีดยาที่ดูดน้ำยาแล้ว

จ. เสียบกระบอกฉีดยากับกระบอกพลาสติกที่ตอกไว้ที่ต้น

ฉ. สภาพการฉีดยาที่ลำต้น

เนื่องจากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในสวนเกษตรกรไม่ประสบความสำเร็จ สาเหตุหนึ่งอาจเนื่องจากต้นที่ทดลองฉีดสารเคมีนั้นแสดงอาการโรครุนแรงเชื้อแพร่กระจายทั่วทั้งต้น เกินขีดความสามารถของสารเคมีที่จะยับยั้งได้ หรือประสิทธิภาพของสารเคมีที่เลือกมาทดลองนั้นไม่เพียงพอจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติม

**7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 2)**

ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 5 ส่วนสารเคมีที่ใช้ได้แก่ Streptomycin, Dexan, Streptomycin+Dexan, Oxytetracycline และ Penicilin G

**8. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในสวนเกษตรกร (ครั้งที่ 2 )**

สืบเนื่องจากการทดลองครั้งแรกนั้นพืชอาจแสดงอาการรุนแรง เชื้อกระจายไปทั่วต้นแล้ว ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จึงทำการทดลองฉีดสารเคมี โดยให้เกษตรกรเป็นผู้ทรีตยาทันทีที่พบอาการผิดปกติ เมื่อพบหยดยางสีขาวที่ลำต้น หรือกิ่งใดกิ่งหนึ่ง หรือเริ่มมีอาการใบเหลือง ซึ่งถือเป็นอาการขั้นต้นของโรคนี้ และนอกจากทำการทดลองกับจำปาดะขนุนแล้วยังทดลองกับขนุนด้วย สารเคมีที่เลือกใช้ได้แก่ Oxytetracycline, Dexan, Streptomycin+Dexan ส่วน Penicilin G นั้นแม้ว่าจะให้บริเวณการยับยั้งกว้างเท่ากับ Oxytetracycline แต่ความคมชัดน้อย โดยเชื้อถูกยับยั้งระยะหนึ่งหลังจากปรับตัวได้จึงเจริญตามปกติจึงไม่เลือกใช้

**9. การทดสอบหาสายพันธุ์จำปาดะขนุน,จำปาดะ หรือขนุนที่ต้านทานต่อ E. nigrifluens**

สืบเนื่องจากการสำรวจพบว่า จำปาดะขนุน จำปาดะ และขนุนบางต้นในแหล่งที่มีการระบาดของโรคนี้รุนแรง เช่นที่สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ และนายเดชา ภัทรชนม์ พืชบางต้นยังสามารถเจริญเติบโตตามปกติ ในขณะที่ต้นพืชรอบๆ แสดงอาการของโรคและตาย จึงได้วางแผนการทดลองเพื่อตรวจสอบการต้านทานโรคโดยการปลูกเชื้อ แต่ไม่สามารถกระทำบนต้นพืชของเกษตรกรได้ จึงได้ทำการขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อได้ต้นกล้าในหลอดทดลองแล้วจึงนำมาทดสอบโรคต่อไป

**การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายยอดพืชตระกูลขนุน**

ปลายยอดพืชสกุลขนุนที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้แก่จำปาดะขนุน และจำปาดะพื้นบ้าน จากสวนนายเดชา ภัทรชนม์ จำปาดะขนุนต้นที่ไม่เคยเป็นโรค และต้นที่เคยเป็นโรค ต่อมาเจริญเติบโตเป็นปกติ ให้ผลผลิต จำปาดะขนุนที่ได้จากการเพาะเมล็ดและขนุนทองนาทวี ซึ่งปลูกที่ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช ทั้งสองต้นนี้ไม่เคยมีเชื้อเข้าทำลาย

ทำการเก็บรวบรวมปลายยอดพืชเหล่านี้มายังห้องปฏิบัติการ ล้างบริเวณผิวด้านนอกด้วยน้ำยาล้างซันไลท์ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกลาง ล้างด้วยน้ำไหล 5-10 นาที จากนั้นตกแต่งส่ วนที่เสียหายเนื่องจากน้ำยาล้างออก นำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้ออีกครั้งด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 1.25 % 20 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง ลอกเปลือกหุ้มด้านนอกที่เรียกว่า leaf scale ออกจนเหลือ 1-2 ชั้นจึงนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานมูราชิกและสกุค (Murashige and Skoog) หรือสูตรเพาะเลี้ยงไม้เนื้อแข็ง (Woody Plant Medium, WPM) เติมกรดแนปทาลีนอะซิติก (NAA) และเบนซิลอะดีนีน (BA) ความเข้มข้นต่างๆ หรือเติม BA ร่วมกับไธไดอะซูรอน (TDZ) ความเข้มข้นต่างๆ อาหารทุกสูตรเติมน้ำตาลซูโครส 3% และทำให้แข็งโดยเติมวุ้นไฟต้าเจล 0.15% หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 6-10 สัปดาห์ ตรวจผลความสามารถในการสร้างยอดรวมจากการเลี้ยงในแต่ละสูตรอาหารและควบคุมการเจริญเติบโต

จากการที่ ไม่สามารถขยายพันธุ์จำปาดะขนุน จำปาดะพื้นบ้าน และขนุนโดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ จึงได้ทำการทดลองในขนุนสายพันธุ์ต่างๆ ที่มีจำหน่าย ได้แก่พันธุ์เหลืองมาเลย์ ไพศาลทักษิณ โชคอนันต์ ทองนาทวี เหลืองบางเตย ต้นพันธุ์ขนุนเหล่านี้ ได้จากการทาบกิ่งอายุ 1 ปี ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธี leaf axil injection โดยเตรียมสารละลายเชื้อ (bacterial suspension) ที่ได้จากเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง และละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่นได้ค่า OD.0.1 ซึ่งจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า มีปริมาณเชื้อจำนวน $1.1 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นฉีดยาเข้าที่ตาใบของใบที่ 3 จากยอด จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดทับด้วยสำลีตรงรอยแผล คลุมด้วยถุงพลาสติกเพื่อให้ความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่งโมง จึงดึงถุงออก บันทึกผลโดยสังเกตอาการเหี่ยวหรือตาย หากต้นตายให้ทำการแยกเชื้อจากต้นนั้นอีกครั้งหนึ่ง

**10. การศึกษาอาหารเฉพาะที่ใช้ในการแยกเชื้อ** E. nigrifluens

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์หลักคือ พัฒนาสูตรอาหารเฉพาะ (selective media) เพื่อใช้ในการแยกเชื้อ E. nigrifluens จากดินและแมลง จึงแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ การทดลองใช้เชื้อ E. nigrifluens ที่ทำการพิ สูจน์แล้ว เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีและประสิทธิภาพของอาหาร การทดลองส่วนที่สอง เป็นการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารในการแยกเชื้ อนี้จากดิน การทดลองแบ่งเป็นลำดับขั้นดังนี้

**10.1 ศึกษาหาอัตราความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบ**

นำเชื้อแบคทีเรีย E. nigrifluens หมายเลข G-32 ซึ่งทำการพิสูจน์แล้วที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 24 ชั่งโมง ละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 200 มล. เพื่อให้ได้สารละลายของแบคทีเรี ย (bacterial suspension) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ให้มีค่าดูดกลืนแสง (O.D.) 0.1, 0.2 และ 0.3 ตามลำดับ ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $10^{-5}$, $10^{-6}$ และ $10^{-7}$ ตามลำดับ นำสารละลายแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่หลอมและปล่อยให้อุ่น อุณหภูมิประมาณ 53 องศาเซลเซียส จำนวน 10 มล. เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-3 วัน บันทึกผลการทดลองโดยนับและคำนวณจำนวนโคโลนี (เซลล์/มล.) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

**10.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารสูตรต่าง ๆ**

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจาก EMB โดยมีปัจจัยตัวแปร 2 ปัจจัย คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งของไนโตรเจน แหล่งของคาร์บอนในการทดลองนี้ได้แก่ lactose, sucrose, rhamnose, arabinose และ xylose ส่วนแหล่งไนโตรเจนได้แก่ peptone และ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณของสารต่างๆ ที่ใช้ดังสรุปในตารางที่ 1 ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ MS เพื่อทำการเปรียบเทียบ (สูตรอาหารแสดงในภาคผนวก) นำเชื้อแบคที เรีย E. nigrifluens ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA อายุ 24 ชั่วโมง เตรียมให้ได้สารละลายแบคทีเรียที่มีความเข้มข้นเหมาะสม จากการทดลองในข้อที่ 10.1 นำสารละลายแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทดสอบ 10 มิลลิลิตร เทใส่ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่

อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองทุกวันโดยการนับและคำนวณโคโลนี (เซลล์/มล.) วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาอื่นๆ เช่น สีของโคโลนี ระดับผิวหน้า และการสร้าง slimes พร้อมทั้งบันทึกภาพ

วางแผนการทดลองแบบ CRD 14 ทรีตเม็นต์ 4 ซ้ำ อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน คือ 1 หน่วยการทดลอง กำหนดปัญหาการทดลอง กับชนิดของอาหารดังนี้ ทรีตเม็นต์ที่ 1 - 12 คือ อาหาร EMB Mod 1. ถึง EMB Mod.12 ตามลำดับ ส่วนทรีตเม็นต์ที่ 13 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (nutrient agar) และทรีตเม็นต์ที่ 14 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MS (Miller and Schorth)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบอาหารและปริมาณสารอาหารในสูตรดัดแปลงชนิดต่างๆ (หน่วยเป็นกรัม)

| EMB Mod. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| peptone | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | - | - | - | - | - | - |
| (NH4)2SO4 | - | - | - | - | - | - | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| lactose | 5 | - | - | - | - | 5 | 5 | - | - | - | - | 5 |
| sucrose | - | 5 | - | - | - | 5 | - | 5 | - | - | - | 5 |
| rhamnose | - | - | 5 | - | - | - | - | - | 5 | - | - | - |
| arabinose | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - | 5 | - | - |
| xylose | - | - | - | - | 5 | - | - | - | - | - | 5 | - |
| eosin Y | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| metthylene | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 | 0.65 |
| Cyclohexan | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 |
| K2HPO4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| agar | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 | 15 |

ปรับ pH 7 ในทุกสูตรอาหาร

**10.3 การแยกเชื้อ E. nigrifluens จากตัวอย่างดินผสมกับเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค**

เตรียมดินสำหรับการทดสอบ โดยการนำดินบริเวณโคนต้นจำปาดะขนุนที่เป็นโรคต้นแห้งตาย คลุกรวมกับเนื้อเยื่อที่แสดงอาการโรคซึ่งสับเป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำดินที่เตรียมไว้ 0.05 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 9.95 มิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้น $10^{-5}$ นำสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารทดสอบ 10 มิลลิลิตร เทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน บันทึกผลการทดลอง โดยนับจำนวนและวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของแบคทีเรีย E. nigrifluens และบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยวางแผนการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 10.2

**11. สำรวจการระบาดของโรค และการเป็นพาหะนำโรคของแมลง**

จากการที่ได้ศึกษาวิจัยเบื้องต้นเกี่ยวกับโรคต้นแห้งตายของพืชตระกูลขนุน พบว่าพืชเป็นโรคเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และจากสมมุติฐานว่า แมลงอาจเป็นพาหะของโรค จึงได้วางแผนสำรวจการแพร่ของโรคและสำรวจแมลง ซึ่งดำเนินการทดลองดังนี้

**11.1 สำรวจการระบาดของโรค**

ได้ทำการสำรวจและนับจำนวนต้นจำปาดะขนุนที่แสดงอาการโรคและต้นตายที่สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ ซึ่งปลูกจำนวน 126 ต้น มีอายุระหว่าง 10-15 ปี และเป็นต้นที่ให้ผลผลิตแล้วทั้งสิ้น ดำเนินการตั้งแต่ มกราคม 2533 ถึง ธันวาคม 2536

**11.2 การสำรวจแมลงในสวนเกษตรกร**

สวนที่เลือกคือสวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ ทำการสำรวจทุกๆ 2 สัปดาห์ ตั้งแต่ 13 ตุลาคม 2533 ถึง 7 กรกฎาคม 2536 เป็นจำนวน 63 ครั้ง โดยใช้วิธีกับดักแสงไฟ (light trap) ซึ่งมีขวดรองรับแมลงอยู่ด้านใต้กรวย แสงที่ใช้คือแสง black light ( near ultra violet) ความยาวคลื่นแสง 360 นาโนเมตร เปิดแสงไฟเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บแมลงตอนเช้า นำมาแยกชนิด และนับจำนวนแมลงที่พบในแต่ละครั้ง บันทึกข้อมูล เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดและจำนวนประชากรของแมลงตลอดปี และวิเคราะห์ร่วมกับการระบาดของโรคซึ่งบันทึกไว้ทุก 2 สัปดาห์เช่นกัน

**11.3 การตรวจหาเชื้อที่ติดมากับแมลง**

จากแมลงที่ได้จากการวางกับดักแสงไฟ เมื่อนับและจำแนกชนิดแล้ว นำมาตรวจหาเชื้อ E. nigrifluens ที่อาจมีอยู่ในแมลงด้วยวิธี streak plate และ dilution pour plate โดยบดขยี้แมลงในโกร่งที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ละเอียด จากนั้นนำมา streak บนอาหารเฉพาะ EMB Mod.2 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ผ่านมา และบนอาหาร PSA (potato semi-synthetic agar) บ่มเลี้ยงไว้ใน incubator ปรับอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาคัดเลือกโคโลนีของ E. nigrifluens ทำการแยกเชื้อจากแมลงทุกชนิด หากมีจำนวนมากให้สุ่มมาเพียงชนิดละ 3 ตัว

**12. การควบคุมโรคต้นแห้งตายด้วยวิธีผสมผสาน**

ในการทดลองที่ผ่านมาการใช้ปฏิชีวนสารประเภทเดียวมักไม่ได้ผล จึงได้ทำการทดลองใช้ปฏิชีวนสารร่วมกับสารเคมี Foli-R-Fos 400 ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดราชั้นต่ำและส่งเสริมความแข็งแรงให้กับพืช โดยการฉีดสาร Foli-R-Fos 400 ความเข้มข้น 1:1 (สาร:น้ำ) จำนวน 25 มิลลิลตร หลังจากนั้น 1 วันจึงฉีดปฏิชีวนสารที่ใช้ได้แก่ Tetracycline, Dexan และ Streptomycin ที่ความเข้มข้น 3,000 ppm. จำนวน 25 มิลลิลิตร สำหรับการปฏิบัติทางเขตกรรมนั้น ได้ตัดแต่งกิ่งที่เป็นโรคและเผาทำลายพร้อมกับให้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 จำนวน 2 กิโลกรัมต่อต้น ทำการทดลองโดยใช้ Foli-R-Fos 400 ร่วมกับปฏิชีวนสารชนิดละ 3 ต้น ทำการทดลองที่สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ และนายเดชา ภัทรชนม์ โดยก่อนทำการทรีตยา บันทึกลักษณะอาการของโรคและระดับการเกิดโรคดังนี้

ระดับ 1 พืชแสดงอาการใบเหลืองส้ม ไม่มียางไหลที่กิ่งหรือลำต้น

ระดับ 2 พืชแสดงอาการใบเหลืองส้ม มียางไหลที่เฉพาะที่กิ่ง

ระดับ 3 พืชแสดงอาการใบเหลืองส้ม มียางขาวและน้ำไหลออกจากลำต้นใบร่วง

ระดับ 4 พืชแสดงอาการใบร่วง ผลร่วง เปลือกลำต้นล่อน

หลังจากนั้นบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของพืชทุกสัปดาห์ หรือทุกเดือน เป็นเวลา 15 เดือน

นอกจากนั้นได้ทำการสุ่มดินที่สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ จำนวน 98 ตัวอย่าง จากจำปาคะขนุน 98 ต้น โดยขุดต้นละ 5 จุดแล้วรวมเป็นถุงเดียวกัน วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของดินที่อาจส่งเสริมให้เกิดโรคระบาดยิ่งขึ้น

# ผลการทดลอง

## 1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี direct streak และ dilution plate บนอาหาร NA ได้โคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียที่เหมือนกันจำนวนมาก โคโลนีมีลักษณะกลม ผิวหน้านูนเล็กน้อย ขอบเรียบ สีขาวโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน พบว่ามีรูปร่างท่อนขนาด 0.72-0.78x2.9-4.. ไมครอน (เฉลี่ยจากการวัด 30 เซลล์) มักอยู่เซลล์เดียวเคลื่อนที่ได้ด้วย flagella แบบรอบตัว (perritrichous) มี 4-5 เส้น

## 2. การตรวจดูกลุ่มของแบคทีเรียในเนื้อเยื่อพืช

จากเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรค เมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยตัดเนื้อเยื่อตามแนวยาว ตรวจพบกลุ่มของแบคทีเรียจำนวนมาก ในส่วนของ phloem fiber และ ray parenchyma การเข้าทำลายมีอยู่ทั้งระหว่างเซลล์ (intercellular) และเข้าไปในเซลล์ (intracellular) โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรีย อาจจะรวมอยู่เป็นกลุ่มหรือกระจายตลอดแนวของ phloem fiber ส่วน ray parenchyma นั้นเชื้อมักอยู่เป็นกลุ่ม (รูปที่ 3) แบคทีเรียที่พบมีรูปร่างเป็นท่อน ขนาดของเซลล์เล็กกว่าเมื่อนำมาเลี้ยงและศึกษาจำนวน flagella ที่มีขนาด 0.45-0.47x1.71-3.13 ไมครอน ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยจากการวัด 30 เซลล์ อย่างไรก็ตามการศึกษาเนื้อเยื่อครั้งนี้ไม่พบเชื้อเข้าทำลาย xylem

## 3. การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค

การปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าอายุ 3 เดือนพบว่าจำปาตะขนุนแสดงอาการของโรคไม่เด่นชัด เมื่อทำการถากเปลือกตรงจุดที่มีการปลูกเชื้อจึงพบจุดแผลสีน้ำตาล ขนาด 2x5 มิลลิเมตร และไม่ขยายลามออกไปอีก ในขณะที่ต้นที่ใช้น้ำแทนแบคทีเรียไม่เกิดอาการลักษณะดังกล่าวนี้ เมื่อทดสอบบนต้นที่สมบูรณ์เต็มที่ก็มีลักษณะคล้ายคลึงกัน จากการถากเปลือกหลังจากการปลูกเชื้อ 1 เดือนพบว่า แผลขยายใหญ่ มีขนาด 2x10 มิลลิเมตร มีความเป็นไปได้ที่จะขยายลามเป็นริ้วตามความยาวของลำต้น หากมีอุณหภูมิที่เหมาะสม

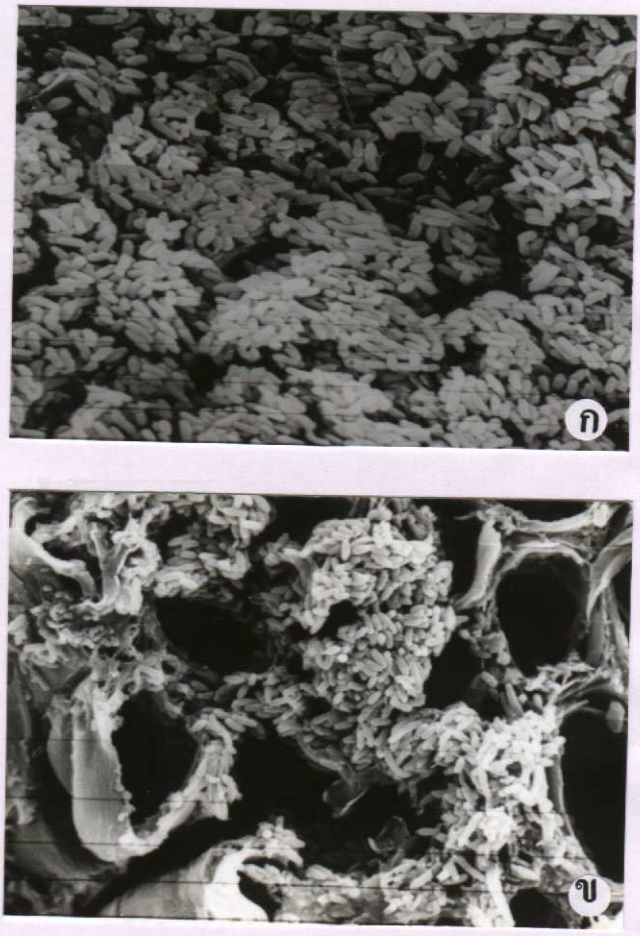
**รูปที่ 2** อาการของโรคต้นแห้งตายของจำปาดะขนุน

ก. จำปาดะขนุนแสดงอาการโรคทั้งต้น

ข. ต้นที่แสดงอาการโรค, ใบ, ผลร่วง

ค. หยดยางสีขาวและยางไหลสีดำที่ลำต้น

ง. อาการใต้เปลือก เมื่อถากจากจุดที่มีหยดยางสีขาว




**รูปที่ 3** กลุ่มของแบคทีเรียที่พบในส่วนของ phloem และ ray parenchyma (x 3,000)

**4. การจำแนกชนิดของเชื้อ**

ผลการทดลองดังสรุปในตารางที่ 2-5 และจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ได้เป็น Erwinia nigrifluens

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY



ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของเชื้อจากจำปาดะขนุนที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชสกุลต่าง ๆ

| Character[a] | Unknown[b] | Clostridium | Bacillus | Streptomyces | Clavibacter | Agrobacterium | Erwinia | Pseudomonas | Xanthomonas |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gram positive | — | + | V+ | + | + | — | — | — | — |
| Spores formed | — | + | + | — | — | — | — | — | — |
| Yellow colony on YDC medium | — | — | — | — | +[c] | — | V— | — | +[d] |
| Fluorescent pigment on KB medium | — | — | — | — | — | — | — | V+ | — |
| Grows anaerobically | + | + | + | — | — | — | + | — | — |
| Grows aerobically | + | — | + | + | + | + | + | + | + |
| More than four peritrichous flagella | + | V+ | V+ | — | — | — | + | — | — |
| Growth on D – 1 agar | — | — | — | — | — | + | — | — | — |
| Growth on MS medium | + | — | — | — | — | — | + | V— | — |
| Aerial mycelium | — | — | — | + | — | — | — | — | — |

a ข้อมูลจาก Schaad (1986)

b เชื้อจำนวน 8 isolates ซึ่งแยกได้จากแต่ละต้น

c โคโลนีของ *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* ไม่มีสี

d โคโลนีใน pathovars *manihotis* และ *aibilinians* ไม่มีสี

v Variation

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อจากจำปาดะขนุนเปรียบเทียบกับ *Erwinia nigrifluens, E. rubrifaciens, E. quercina, E. salicis* และ *E. carotovora* var. *carotovora*

| Test | Unknowna | E. nigrifluens[b] | E. rubri- faciens[b] | E. quercina[b] | E. salicis[b] | E. carotovora var. carotovora[c] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Growth on MS medium | + | + | + | + | — | ND |
| Tobacco hypersensitivity | — | — | — | — | — | ND |
| Patato soft rot | — | ND | ND | ND | ND | + |
| Pectate degradation | +2 | +2 | +2 | +2 | +2 | ND |
| Growth factor required | — | — | — | + | — | ND |
| Pink pigment on YDC medium | — | — | + | — | — | ND |
| Growth at 36° C | + | + | + | + | — | + |
| Growth at 39° C | ND | ND | ND | ND | ND | — |
| $H_2S$ from cysteine | + | + | + | + | + | + |
| Urease production | + | + | — | — | — | ND |
| Indole production | — | — | — | — | — | — |
| Nitrate reduction | — | — | — | — | — | ND |
| Gelatin liquification | — | — | — | — | — | + |
| Motility | + | + | + | + | + | + |
| Growth in 5% NaCl | + | + | + | + | + | + |
| Catalase | + | ND | ND | ND | ND | +[w] |
| oxidase | — | ND | ND | ND | ND | — |
| acetoin production | +[s] | ND | ND | ND | ND | V— |
| MR production | +[w] | ND | ND | ND | ND | + |
| prosphatase | ND | ND | ND | ND | ND | — |

a เชื้อจำนวน 8 isolates ซึ่งแยกได้จากแต่ละต้น

b ข้อมูลจาก Fahy และ Persley (1983) และ Schaad (1986)

c ข้อมูลจาก Lim (1983)

s ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ

w ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเล็กน้อย

ตารางที่ 4 การสร้างกรดจากแหล่งคาร์บอนของเชื้อที่แยกได้ เปรียบเทียบกับ *Erwinia nigrifluens, E. quercina, E. rubrifaciens* และ *E. salicis* และ *E. carotovora* var. *carotovora*.

| C-sources/ isolates | G 32 | R 1 | D 52 | D 5 | P 2 | G 46/1 | D n | D 51 | E. nigrifluens[a] | E. quercina[a] | E. rubrifaciens[a] | E. salicis[a] | E. carotovora var. carotovora |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| adonitol | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | ND |
| aesculin | + | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | + | ND |
| cellobiose | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | — | — | ND |
| dulcitol | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| glycerol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | d | d | ND |
| inositol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ND |
| lactose | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | — | — | + |
| mannitol | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ND |
| melibiose | — | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — | + | ND |
| -methylglucoside | | | | | | | | | | | | | |
| raffinose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | + | + |
| rhamnose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | — | ND |
| ribose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ND |
| salicin | + | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | + | ND |
| sorbitol | — | — | — | — | — | — | — | — | + | + | + | + | ND |
| starch | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| trehalose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | — | + | — | + |
| xylose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | — | — | — | + |
| arabinose | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | + | — | + | ND | — |
| maltose | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | — |

a ข้อมูลจาก Bradbury (1981), Fahy และ Persley (1983) และ Schaad (1986)

b ข้อมูลจาก Lim (1983)

c ND = not determined

ตารางที่ 5 ความสามารถในการใช้สารประกอบอินทรีย์ของเชื้อจากจำปาดะขนุนเปรียบเทียบกับ Erwinia nigrifluens, E. quercina, E. rubrifaciens, E. salicis และ E. carotovora var. carotovora

| isolate | Unknown | | | | | | | | *E. nigrifluens* | *E. quercina* | *E. rubrifacien* | *E. salicina* | *E. carotovora var. carotovora* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| compound | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | | | |
| citrate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| tartrate | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | - | - |
| galacturonate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ND |

a ข้อมูลจาก Fahy และ Persley (1983)

b ข้อมูลจาก Lim (1983)

**5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 1)**

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี (ปฏิชีวนสาร) 4 ชนิดในห้องปฏิบัติการได้แก่ Streptomycin, Chloramphenical, Tetracycline และ Dexan ที่ระดับความเข้มข้น 500, 1,000 และ 1,500 ppm. พบว่า Tetracycline ทุกความเข้มข้น และ Dexan ที่ความเข้มข้น 1,500 ppm. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้กว้างและคมชัด ส่วน Chloramphenical แม้จะให้บริเวณยับยั้งกว้าง แต่ไม่คมชัด เป็นการยับยั้งได้เฉพาะระยะแรก หลังจากนั้นเชื้อมีการปรับตัว และเจริญได้ตามปกติดังสรุปในตารางที่ 6 ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี ในสวนเกษตรกรครั้งที่ 1 จึงเลือกใช้ Tetracyclin, Streptomycin และ Dexan

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบประสิทธิภาพสารเคมี 4 ชนิดในห้องปฏิบัติการต่อเชื้อ E. carotovora (ครั้งที่ 1)

| สารเคมี | | ค่าเฉลี่ยของ clearzone(ซม.) | ระดับความคมชัดของ clear zone |
|---|---|---|---|
| streptomycin | 500ppm. | 1.3700 (ef) | — |
| streptomycin | 1,000 ppm. | 1.4000 (de) | — |
| streptomycin | 1,500 ppm. | 1.5667 (d) | — |
| chloamphilical | 500ppm. | 1.3100 (f) | + |
| chloamphilical | 1,000 ppm. | 2.0333( b) | + |
| chloamphilical | 1,500 ppm. | 2.0900 (b) | + |
| tetracycline | 500ppm. | 2.0007(b) | — |
| tetracycline | 1,000 ppm. | 2.6100 (a) | — |
| tetracycline | 1,500 ppm. | 2.6533(a) | — |
| dexan | 500ppm. | 1.4100 (def) | — |
| dexan | 1,000 ppm. | 1.8622 (c) | — |
| dexan | 1,500 ppm. | 1.8100 (c) | + |
| control | | 0.5500 (g) | - |
| F-test | | 209.6670 | |
| CV% | | 3.87000 | |

หมายเหตุ : 1. ทุกตัวเลขที่ตามด้วยอักษรต่างกันจะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

2. — หมายถึง คมชัดมาก
— หมายถึง คมชัดปานกลาง
\- หมายถึง ในระยะแรกคมชัด ต่อมามีเชื้อเจริญ
. หมายถึง เชื้อเจริญตามปกติ

**6. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในสวนเกษตรกร (ครั้งที่ 1)**

จากการใช้สารเคมีฉีดเข้าลำต้นจำปาดะขนุนที่แสดงอาการโรค และตรวจผลลักษณะอาการของต้นนั้นๆ ทุกสัปดาห์ พบว่าในระยะแรก พืชแสดงอาการดีขึ้นเล็กน้อย ใบหยุดร่วงบางต้นมีการแตกใบใหม่ แต่ส่วนใหญ่จะตาย แสดงว่าสารเคมีไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณการทำลายของเชื้อได้

**7. การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ (ครั้งที่ 2)**

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี 5 ชนิดได้แก่ Streotomycin, Dexan, Streptomycin+Dexan, Oxytetracycline และ Penicillin G พบว่า Oxytetracycline ที่ระดับความเข้มข้น 1,500, และ1,000 ppm. มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุดคือ clear zone เฉลี่ย 2.9 และ 2.767 ตามลำมีความคมชัดมาก รองลงมาคือ Streptomycin + Dexan ที่ระดับความเข้มข้น 1,500 ppm.ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ 1.867 เซ็นติเมตร และบริเวณการยับยั้งมีความคมชัดมาก ส่วน Penicillin G นั้นแม้ว่าจะให้ clear zone กว้างถึง 2.9 เซ็นติเมตรเช่นเดียวกับ Oxytettracycline แต่ในวันต่อมาเชื้อสามารถปรับตัวและเจริญได้ แสดงว่า Penicillin G ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ E. nigrifluens ผลการทดลองสรุปในตารางที่ 7

**ตารางที่ 7** เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเคมี 5 ชนิดในห้องปฏิบัติการต่อเชื้อ E. nigrifluen.. (ครั้งที่ 2)

| สารเคมี | ความเข้มข้น (ppm.) | ค่าเฉลี่ยของ clear zone(ซม.)[1] | ระดับความคมชัดของ clear zone |
|---|---|---|---|
| streptomycin | 500 | 1.3700$^{ef}$ | ++ |
| streptomycin | 1,000 | 1.4900$^{de}$ | ++ |
| streptomycin | 1,500 | 1.5667$^{i}$ | ++ |
| chloramphenical | 500 | 1.3100$^{f}$ | + |
| chloramphenical | 1,000 | 2.0333$^{b}$ | + |
| chloramphenical | 1,500 | 2.0900$^{b}$ | + |
| tetracycline | 500 | 2.0007$^{b}$ | ++ |
| tetracycline | 1,000 | 2.6100$^{a}$ | ++ |
| tetracycline | 1,500 | 2.6533$^{a}$ | +++ |
| dexan | 500 | 1.4100$^{def}$ | +++ |
| dexan | 1,000 | 1.8633$^{c}$ | +++ |
| dexan | 1,500 | 1.8100$^{c}$ | +++ |
| control | | 0.5500$^{g}$ | - |
| F-test | | 209.667 | |
| .CV (%) | | 3.87 | |

**หมายเหตุ** :
1. ทุกตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันจะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT
2. +++ หมายถึง คมชัดมาก
   ++ หมายถึง คมชัดปานกลาง
   + หมายถึง ในระยะแรกคมชัด ต่อมามีเชื้อเจริญ
   - หมายถึง เชื้อเจริญตามปกติ

**8. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในสวนเกษตรกร (ครั้งที่ 2)**

ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีโดยเกษตรกรที่คัดเลือกไว้ในโครงการ จำนวน13 ราย ตั้งแต่เดือน มกราคม 2535 ถึงเมษายน 2536 ได้ทำการทดสอบฉีดสารเคมีชนิดต่างๆ ตามที่มอบไว้ กับต้นจำปาดำขนุน 15 ต้น ขนุนจำนวน 12 ต้น จากต้นที่เป็นโรคทั้งหมดในระยะเวลาดังกล่าว จำนวน 27 ต้น

จากการติดตามผลพบว่าในการทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสาร Oxytetracycline ที่อัตราความเข้มข้น 2,500 ppm.กับจำปาดะขนุน จำนวน 15 ต้น จำปาดะขนุน มีอาการดีขึ้น ผลิใบตามปกติ จำนวน 9 ต้น (+9/15) ตายไปจำนวน 6 ต้น (-6/15) คิดเป็น 60 และ 40% ตามลำดับ และในระยะเดียวกันนี้ขนุนเป็นโรค จำนวน 12 ต้น เกษตรกรได้ทำการทรีตปฏิชีวนสารดังนี้คือ Oxytetracycline, Dexan และ Dexan+ Streptomycin ที่อัตราความเข้มข้น 2,500 ppm. โดยฉีดเข้าลำต้นขนุน 9 , 2 และ 1 ต้น ตามลำดับ ปรากฏว่า ต้นขนุนที่ทรีตด้วย Oxytetracycline ทั้ง 9 ต้นมีอาการดีขึ้น ผลิใบและให้ผลผลิตตามปกติ ต้นที่ทรีตด้วย Dexan อย่างเดียว ตาย 2 ต้น ส่วนขนุน 1 ต้น ที่ทรีตด้วย Dexan+ Streptomycin ไม่ตาย แต่ต้นทรุดโทรมค่อนข้างมาก ข้อมูลต่างๆ สรุปในตารางที่ 8

**9. การทดสอบหาสายพันธุ์จำปาดะขนุน จำปาดะ หรือขนุนที่ต้านทานต่อเชื้อ E. nigrifluens**

จากการนำส่วนปลายยอดพืชตระกูลขนุนมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรต่างๆ สำหรับเป็นวัสดุในการปลูกเชื้อเพื่อศึกษาการต้านทานโรค พบว่าการพัฒนาการของปลายยอดในอาหาร2 ทุกสูตรช้ามาก ในอาหารเติม NAA ร่วมกับ BA ส่งผลให้ชิ้นส่วนพืชสร้างสารประกอบฟีนอลเป็นจำนวนมาก สารดังกล่าวปลดปล่อยลงในอาหารและยับยั้งการเจริญพัฒนาของชิ้นส่วนพืช ทำให้ชิ้นส่วนปลายยอดตายในเวลาต่อมา ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเติม BA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร และ TDZ เข้มข้น 0.1 -0.5 มิลลิกรัม/ลิตรนั้นลดการสร้างสารได้มาก อย่างไรก็ตามการพัฒนาปลายยอดยังคงช้ามาก ยอดที่พัฒนามีเพียงยอดเดียว ไม่สามารถชักนำการสร้างยอดรวมได้ การใช้ TDZ ความเข้มข้นสูงขึ้นส่งเสริมการสร้างแคลลัสที่รอยตัดบริเวณฐานชิ้นส่วนปลายยอด การเติมผงถ่านลงในอาหารเพาะเลี้ยงเข้มข้น 0.25% ไม่มีผลส่งเสริมการยืดยาวและการสร้างยอดรวมจากชิ้นส่วนปลายยอดที่เลี้ยง (รูปที่ 6) แม้ว่ามีรายงานการขยายพันธุ์ขนุน

ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ผลสำเร็จ แต่ผลสำเร็จดังกล่าวขึ้นกับพันธุ์ บางพันธุ์ให้การตอบสนองต่อการเลี้ยงดี ในขณะที่บางพันธุ์ให้การตอบสนองต่ำหรือไม่มีการตอบสนองเลย ในกรณีของขนุนจำปาดะจัดอยู่ในประเภทที่ให้การตอบสนองต่ำมากจำเป็นต้องมีการศึกษาหาสูตรอาหาร สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสม ตลอดจนวิธีการเตรียมชิ้นส่วนพืช และวิธีการเลี้ยงที่เหมาะสม ซึ่งอาจต้องใช้เวลานาน ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้การศึกษาการเกิดโรคจากต้นพันธุ์ที่ต้านทานด้วยวิธีการในหลอดทดลองไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร

และจากการศึกษาปลูกเชื้อบนสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี leaf axil injection ตรวจผลภายใน 2 เดือนไม่มีสายพันธุ์ใดแสดงอาการโรค จึงได้ทำการปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งด้วยวิธีการเดิม พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดแสดงอาการเช่นอีกกัน

**รูปที่ 4** การจัดอบรมให้ความรู้แก่เกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรฉีดต้นพืชที่เป็นโรค
ก., ข. ฉายสไลด์ประกอบคำบรรยาย
ค., ง. ฝึกการฉีดยาเข้าลำต้นและปฏิบัติการจริงที่สวนเกษตรกร

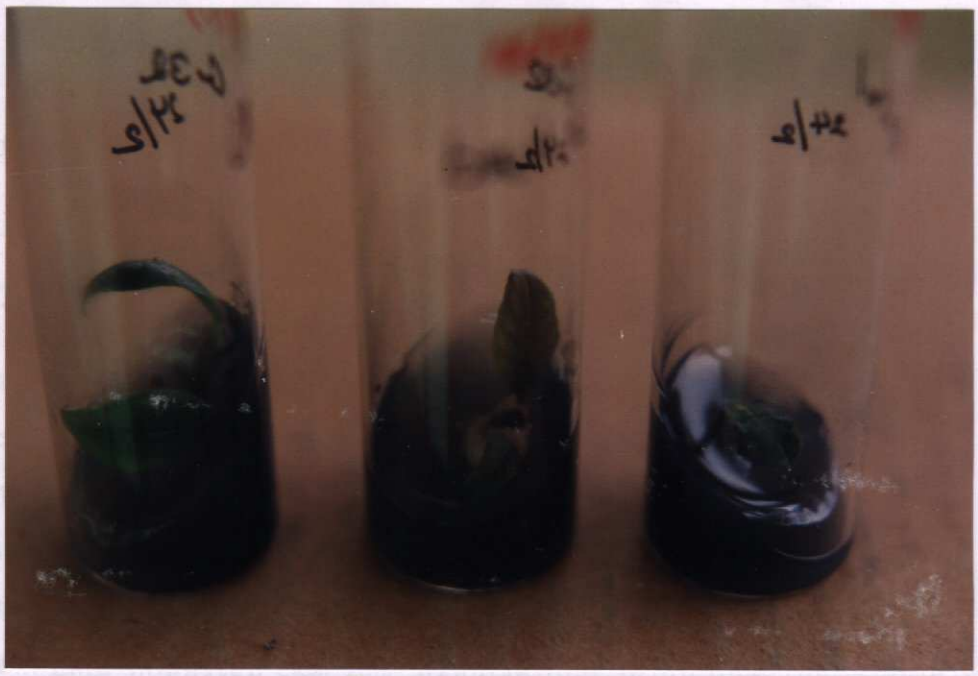
**รูปที่ 5** เปรียบเทียบต้นที่เป็นโรคก่อนทรีตสารเคมี (ก.) และหลังจากทรีตสารเคมี 2 เดือน

งที่ 8 การทดสอบประสิทธิภาพของยาเคมีในการรักษาโรค

| ชื่อ | จำนวนต้นที่เป็นโรค ม.ค.35-พ.ค.36 | สารเคมีที่ใช้ | ผลการฉีดสารเคมี | สภาพพื้นที่/สวน ที่ราบ/ที่ราบเชิงเขา | ชนิดพืช | อาการขณะเริ่มต้น ขณะทรีตสารเคมี (ระดับการเป็นโรค) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. นายเอ่งที่ พรอนุวงศ์ | 4 | 1.Oxytetracycline | + | ที่ราบ | จำปาดะขนุน | (2.) ยางไหลสีขาว ใบเหลืองส้ม 1 กิ่ง |
| | | 2.Oxytetracycline | - | | จำปาดะขนุน | (3.) ยางไหล ใบเหลืองส้มทั้งต้น |
| | | 3.Oxytetracycline | + | | จำปาดะขนุน | (2.) ยางไหลสีขาว ใบเหลือง |
| | | 4.Oxytetracycline | + | | จำปาดะขนุน | (2.) ยางไหลสีขาว ใบเหลือง |
| 2. นายกริ่ม สินธุรัตน์ | 4 | 1.Oxytetracycline | - | ที่ราบเชิงเขา | จำปาดะขนุน | (3.) ยางไหล ใบเหลืองส้มทั้งต้น |
| | | 2. - | - | และบนเขา | จำปาดะขนุน | (4.) ตัดทิ้ง |
| | | 4.Oxytetracycline | - | | จำปาดะขนุน | (3.) ยางไหล ใบเหลืองส้มทั้งต้น |
| | | 4.Oxytetracycline | - | | จำปาดะขนุน | (3.) ยางไหล ใบเหลืองส้ม |
| 3. นายพันธ์ ศรีสุวรรณ | 1 | 1.Oxytetracycline | - | ที่ราบเชิงเขา | จำปาดะขนุน | (4.) ยางไหล ใบเหลืองส้มทั้งต้น ใต้เปลือกมีสีน้ำตาลเป็นทางใหญ่ |
| 4. นายผล ดุลโน | 5 | 1.Oxytetracycline | + | ที่ราบบนเขา | จำปาดะขนุน | (2.) ยางขาว ใบเหลืองส้ม |
| | | 2.Oxytetracycline | + | ปะบนกับพืช | จำปาดะขนุน | (2.) ยางขาว ใบเหลืองส้ม |
| | | 3.Oxytetracycline | + | ชนิดอื่น ๆ | จำปาดะขนุน | (1.) ยางขาว |
| | | 4.Oxytetracycline | + | ให้ปุ๋ยปีละครั้ง | จำปาดะขนุน | (1.) ยางขาว |
| | | 5.Oxytetracycline | + | | จำปาดะขนุน | (1.) ยางขาว |

ตารางที่ 3 [illegible] (ต่อ)

| ชื่อ | จำนวนต้นที่เป็นโรค ม.ค.35-พ.ค.36 | สารเคมีที่ใช้ | ผลการฉีดสารเคมี | สภาพพื้นที่/สวน ที่ราบ/ที่ราบเชิงเขา | ชนิดพืช | อาการขณะเริ่มต้น ขณะทรีตสารเคมี (ระดับการเป็นโรค) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 5. นายแคล้ว ปานกำเนิด | 1 | 1.Oxytetracycline | + | ที่ราบเชิงเขา | จำปาตะขนุน | (2.) มียางขาว ใบเหลืองส้ม |
| 6. นายพงษ์ศักดิ์ พรามโ | 7 | 1.Oxytetracycline | + | ที่ราบ | ขนุน | (2.) ยางขาว ใบร่วง 2 กิ่ง |
| | | 2.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (3.) พบยางไหล เปลือกแห้ง มีใบ ประมาณ 50% ทั้งต้น |
| | | 3.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (3.) ใบร่วง ต้นโทรมทั้งต้น |
| | | 4.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (3.) ใบร่วง ต้นโทรมทั้งต้น |
| | | 5.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (2.) เข้าทำลาย 1 กิ่ง ยางไหล ใบเหลือง 1 กิ่ง |
| | | 6.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (2.) ยางไหล ใบเหลืองร่วง 1 กิ่ง |
| | | 7.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (2.) ยางไหล ใบร่วง 1 กิ่ง |
| 7. นายอดุลย์ เตะมาหมัด | 5 | 1.Dexan | - | ที่ราบ | ขนุน | (2.) ยางขาว ใบเหลือง |
| | | 2.Dexan | - | | ขนุน | (2.) ยางไหล |
| | | 3. Dexan+Strepto | + | | ขนุน | (1.) ยางขาว |
| | | 4.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (3.) ยางไหล เปลือกแฉะ ใบเหลือง |
| | | 5.Oxytetracycline | + | | ขนุน | (2.) ยางขาว ใบเหลือง |



**รูปที่ 6** การเพาะเลี้ยงปลายยอดจำปาดะขนุนในอาหารสูตร MS เติมผงถ่าน 0.25%

**10. การศึกษาอาหารเฉพาะที่ใช้ในการแยกเชื้อ E. nigrifluens**

**10.1 การศึกษาอัตราความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสมในการทดสอบ**

อัตราความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสม $10^{-6}$ ซึ่งคำนวนปริมาณแบคทีเรียได้ $1.1x10^{8}$ เซลล์/มิลลิลิตร

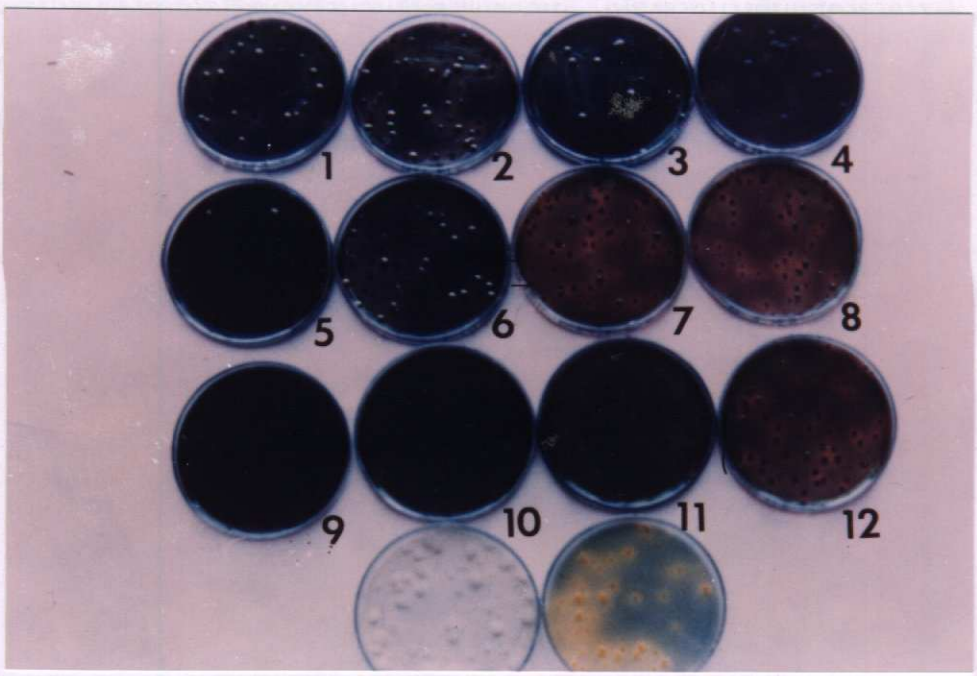
**10.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อบนอาหารสูตรต่าง ๆ**

พบว่าสูตรอาหารที่ดัดแปลงจาก EMB ที่มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน มีสีม่วงเข้มกว่าที่มี $(NH_4)_2SO_4$เป็นแหล่งไนโตรเจน ลักษณะโคโลนีส่วนใหญ่มีลักษณะทรงกลม ผิวนูน ขอบเรียบ เป็นมัน มี slime มาก มีการสร้างเม็ดสีสีม่วง และมีการสร้าง metallic sheen มาก ส่วนสูตรอาหารที่ดัดแปลงจาก EMB ที่มี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนลักษณะโคโลนีส่วนใหญ่ มีลักษณะทรงกลม ผิวนูน ขอบเรียบ เป็นมัน ไม่มี slime มีการสร้างเม็ดสีสีส้มแดง และและมีการสร้าง metallic sheen น้อยกว่า จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียบนสูตรอาหารทั้ง 2 สูตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางผนวกที่ 1) อาหารสูตรดัดแปลงจาก EMB ทุกสูตรจะมี clear zone ปรากฏชัดรอบๆ โคโลนี แสดงว่ามีการใช้อาหารของเชื้อรอบๆโคโลนี ส่วนอาหาร NA ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ สีขาว มี slime มาก ในขณะที่บนอาหาร MS ลักษณะโคโลนีของเชื้อมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ สีส้มแดง มี slime น้อยกว่า (รูปที่ 7)

**10.3 การแยกเชื้อ E. nigrifluens จากตัวอย่างดินผสมกับเนื้อเยื่อพืชที่เป็นโรค**

การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย E. nigrifluens บนอาหารทดสอบ ทำการศึกษาแยกชนิดตรวจนับเฉพาะโคโลนีของ E. nigrifluens เท่านั้น โดยการเปรียบเทียบลักษณะของ E. nigrifluens ที่เจริญบนอาหารทดสอบที่ศึกษาแล้วในข้อ 10.2 ได้จำนวนและขนาดโคโลนีดังแสดงไว้ในตารางผนวกที่ 5 และ 6 การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีบนอาหารทดสอบ 14 ชนิดดังแสดงในตารางผนวกที่ 7 และ 8 ตามลำดับ จากการศึกษาเปรียบเทียบทั้งลักษณะโคโลนีและวิเคราะห์ค่าทางสถิติให้ผลไปในทางเดียวกัน คืออาหารที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้แยกความแตกต่างของโคโลนี หรือใช้แยกเชื้อ E. nigrifluens จากดิน หรือจากตัวอย่างแมลงคือ อาหารสูตร EMB Mod.2 ซึ่งประกอบด้วย peptone 10 กรัม

sucrose 5 กรัม eosin Y 0. 4 กรัม methyline blue 0.65 กรัม $K_2HPO_4$ 2.0 กรัม cyclohexamide 0.025 กรัม และ agar 15 กรัม โดยเชื้อจะมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมัน ขนาดประมาณ 4 มิลลิเมตร มี slime มาก สร้างเม็ดสีสีม่วง และสร้าง metali sheen มากและเมื่อนำไปใช้ในการแยกเชื้อจากแมลง ในการทดลองพบว่ายังมีแบคทีเรียชนิดอื่นเจริญมีลักษณะใกล้เคียงกัน จึงได้พัฒนาสูตร EMB mod.2 โดยเติมปฏิชีวนสาร เช่น Ampicilin, Erytromycin, Polymycin B,และ
Streptomycin เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อตัวอื่นๆ ซึ่งจากการทดลองพบว่า การเจริญของเชื้อต่างๆ ไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร EMB Mod 2.



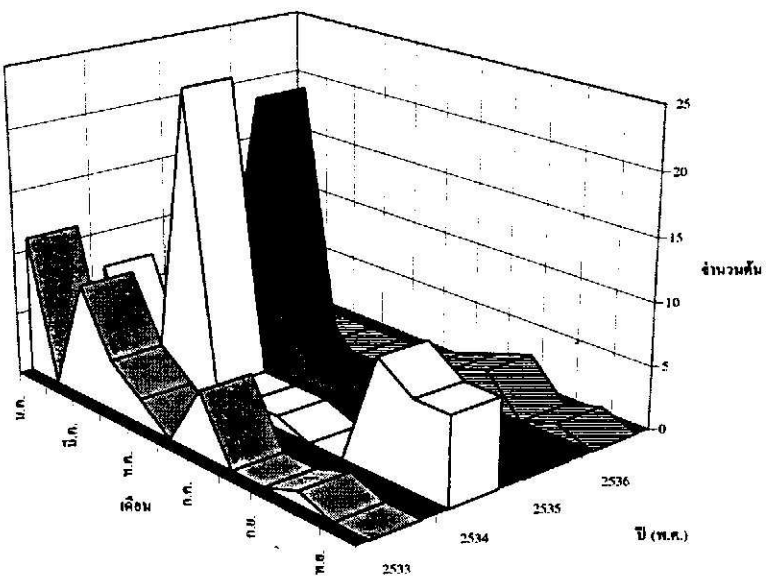

**รูปที่ 7** E. nigrifluens บนอาหาร EMB Mod 1-12, NA และ MS

## 11. การสำรวจการระบาดของโรคและการเป็นพาหะนำโรคของแมลง

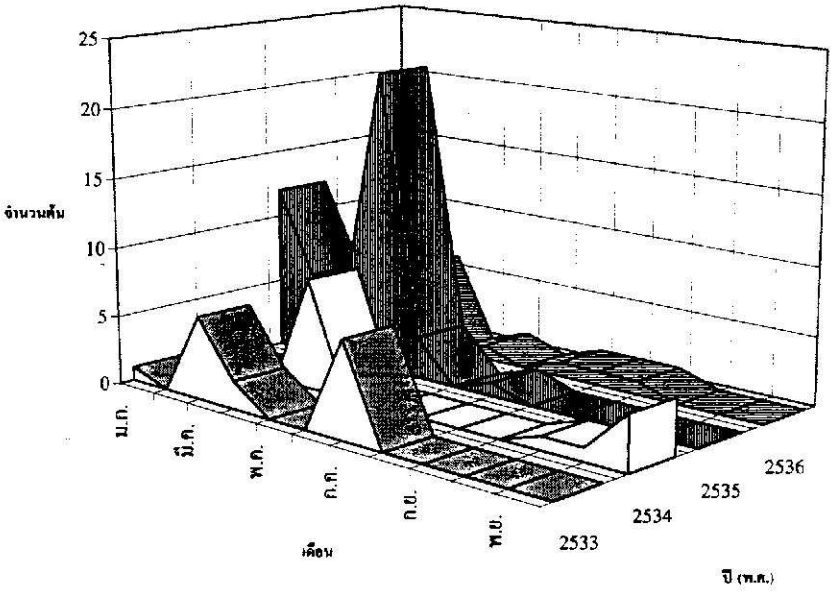
### 11.1 การสำรวจการระบาดของโรค

ตำบลเกาะยอเป็นเกาะที่อยู่ในทะเลสาบสงขลา มีพื้นที่ทั้งสิ้นประมาณ 10 ตารางกิโลเมตร เป็นพื้นที่ราบประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นเป็นภูเขา ปัจจุบันมีสะพานติณสูลานนท์เชื่อมต่อระหว่างเกาะและผืนแผ่นดินใหญ่ ลักษณะพื้นที่ในการปลูกส่วนใหญ่ปลูกบนภูเขาหรือเนินเขา มีส่วนน้อยที่ปลูกบนที่ราบรอบบ้าน โดยแต่ละครัวเรือนอาจปลูกสำหรับบริโภค 2-3 ต้นจนถึงปลูกเป็นการค้าจำนวนมากกว่า 100 ต้น รวมพื้นที่เพาะปลูกจำนวน 13 ไร่

และจากการสำรวจเฉพาะที่สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ ซึ่งปลูกจำปาดะขนุนจำนวน 126 ต้นอายุ 10-15 ปี ให้ผลผลิตทุกต้น โดยสำรวจทุก 1 หรือ 2 สัปดาห์ และรายงานผลโดยสรุปจำนวนต้นที่แสดงอาการโรค และต้นที่ตายในแต่ละเดือน ดังแสดงในรูปที่ 8 และรูปที่ 9 การนำเสนอข้อมูลต้นที่แสดงอาการโรคและจำนวนต้นตายแยกกัน เนื่องจากบางต้นแสดงอาการโรคและตายภายใน 1 เดือน บางต้น 3 เดือนถึง 1 ปี หรือไม่ตายแต่ต้นทรุดโทรมมาก ใบร่วงเหลือใบเพียง 5-10 เปอร์เซ็นต์ของต้นปกติ จากนั้นอาจดีขึ้นหรือตาย เมื่อมีเชื้อเข้าทำลายอีกครั้งหรือเจ้าของโค่นทิ้ง และเปลี่ยนพืชปลูกเป็นกล้วย ละมุด ส้มโอ และอื่นๆ หรือเปลี่ยนไปเลี้ยงสัตว์เช่นหมู และไก่ (รูปที่ 10) ข้อมูลที่น่าสังเกตคือ จำนวนต้นที่แสดงอาการโรคสูงมากในเดือนเมษายน ของปี พ.ศ. 2534 และ พ.ศ.2535 คือสูงถึง 24 และ 22 ต้นตามลำดับ




**รูปที่ 8** จำนวนต้นจำปาดะขนุน สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ ที่แสดงอาการโรคต้นแห้งตาย ตั้งแต่ มกราคม 2533 ถึง ธันวาคม 2536




**รูปที่ 9** จำนวนต้นตายของจำปาดะขนุน สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ เนื่องจากโรคต้นแห้งตาย ตั้งแต่เดือน มกราคม 2533 ถึง ธันวาคม 2536

**11.2 การสำรวจแมลงในสวนเกษตรกร**

ได้ทำการสำรวจแมลงโดยวิธีกับดักแสงไฟจำนวน 63 ครั้ง พบ 67 ชนิด โดยจำนวนและชนิดแตกต่างไปตามฤดูกาล กลุ่มของแมลงที่พบ ได้แก่

ด้วง (Coleoptera)

ด้วงขี้ควาย (Scarabaeidae)

ด้วงดีด (Elateridae)

ด้วงรา (Erotylidae)

ด้วงดิ่ง (Dytiscidae)

แมลงเหนี่ยง (Hydrophidae)

ด้วงงวง (Curculionidae)

ด้วงหนวดยาว (Cerambycidae)

ด้วงก้นกระดก (Staphilinidae)

มอดไม้ (Scolytidae)

ด้วงเจาะไม้ (Bostrichidae)

เพลี้ย (Homoptera)

เพลี้ยกระโดด (Delphacidae)

เพลี้ยจั๊กจั่น (Cicadidae)

เพลี้ยกระโดด (Ricaniidae)

Nephottex sp. (Cicadelidae)

จั๊กจั่นเขา (Membracidae)

เพลี้ยกระโดด (Flattidae)

มวน (Hemiptera)

มวนดอกรัก (Lygaeidae)

มวนเขียว (Pentatomidae)

มวนจู้จี้ (Cydnidae)

ตั๊กแตน (Orthoptera)

ตั๊กแตนหนวดยาว (Tettigoniidae)

ตั๊กแตนหนวดสั้น (Acrididae)

แมลงวัน (Diptera)

บั่วราปีกดำ (Sciaridae)

### 11.3 การตรวจหาเชื้อที่ติดมากับแมลง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียจากแมลงที่ได้จากการล่อโดยวิธีกับดักแสงไฟทุกครั้งด้วยวิธี streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB Mod.2 ซึ่งได้จากการทดลองที่ผ่านมาบางครั้งใช้อาหาร NA และ MS ควบคู่เพื่อเปรียบเทียบ พบเชื้อที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ E. nigrifluens ถึง 4 ชนิด โดยมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ เป็นมัน (มากน้อยแตกต่างกัน) ขนาด 2-5 มิลลิเมตร สร้าง metallic sheen และมี slime ค่อนข้างมาก เมื่อนำมาทดสอบเลี้ยงในอาหาร MS พบว่ามีการเปลี่ยนสีของ bromthymol blue เป็นสีเหลือง มีขนาดโคโลนี 1-1.5 มิลลิเมตร กลม ขอบเรียบ อันเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งอาจมีอยู่ในกระเพาะของแมลงนั้น ๆ ต้องนำเชื้อที่สงสัยจากการแยกทุกๆ สัปดาห์มาศึกษาแยกชนิดของเชื้อดังการทดลองที่ 4 แต่ไม่อาจกระทำได้เนื่องจากเกิดการผิดพลาดในการ sub-culture ทำให้เชื้อที่แยกได้แห้งตาย จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียที่แยกจากแมลงนั้นคือเชื้อ E. nigrifluens ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคนี้หรือไม่

แมลงที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยมีความถี่หรือจำนวนครั้งที่พบเชื้อเหล่านี้มากกว่า 10 ครั้งได้แก่ ด้วงกุหลาบ ด้วงรา ด้วงน้ำ มวนดอกรัก เพลี้ยกระโดด และเพลี้ยจักจั่น

**12. การควบคุมโรคต้นแห้งตายด้วยวิธีผสมผสาน**

ในการทดลองนี้ได้ใช้ใช้ปฏิชีวนสาร เพื่อกำจัดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุโรคร่วมกับ... เคมี Foli-R-Fos 400 เพื่อกำจัดเชื้อและเพิ่มความแข็งแรงต้านทานโรคให้กับพืช ส่วนการป... ทางเขตกรรมนั้นใช้วิธีตัดแต่งกิ่งที่เป็นโรค เผาทำลายทันที จากนั้นให้ปุ๋ยเพื่อเพิ่มความ... สมบูรณ์ บันทึกลักษณะอาการของต้นทุกสัปดาห์ หรือ 2 สัปดาห์ พบว่าในระยะแรกส่วนใหญ่ พืชแสดงอาการดีขึ้น แต่หลังจากนั้นพืชจะแสดงอาการโรคอีกครั้ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากยังคงมี... หลงเหลือที่ลำต้น จึงเพิ่มปริมาณและเข้าทำลายพืชอีกครั้ง หรืออาจเป็นเชื้อที่แพร่ระบาดม... ต้นอื่น ปัจจัยในการทำให้เกิดโรครุนแรง ต้นที่ไม่ตาย และให้ผลผลิตเล็กน้อย ได้แก่ต้นที่พ่น... ด้วยสาร Foli-R-Fos 40 และ Foli-R-Fos 400 +Streoptomycin, Foli-R-Fos 400 +Dexan และ Foli-R-Fos 400 +Oxytetracycline ทรีตเม็นต์ละ 1 ต้น ผลการทดลองดังสรุปในตารางที่ 9

และจากการวัดความเป็นกรด-ด่างของดิน (pH) รอบโคนต้นที่แสดงอาการโรค และ... เกิดโรค จำนวน 98 ต้น จากการตั้งสมมุติฐานว่า pH อาจเป็นปัจจัยเสริมที่ทำให้เกิดโรครุนแ... ขึ้นนั้น พบว่ามี pH ระหว่าง 4.28 ถึง 5.16 เฉลี่ย 4.626 และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลแล้ว pH ของ... ดินไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิดหรือไม่เกิดของโรค และไม่เป็นปัจจัยในการทำให้เกิดโรคร... แรง

**ตารางที่ 9** การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสารร่วมกับ Foli-R-Fos 400

| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Oxytetra.<br>D2 | : พืชแสดงอาการระดับ 2<br>ใบเป็นสีส้ม มียางไหล<br>: 1 เดือนต่อมา ปรากฏใบ<br>เหลืองส้ม 30% ไม่มียางไหล<br>ใบยอดร่วง บางกิ่งผลิใบอ่อน<br>: 2 เดือนต่อมา แห้งตาย<br>1 กิ่งใหญ่ จึงตัดทิ้ง | ส่วนที่เหลือ<br>เจริญดี | ปกติ | ปกติ | ปกติ | ปกติ แต่ยังไม่ให้<br>ผลผลิต |
| D3 | : พืชแสดงอาการระดับ 2<br>ใบเหลืองส้ม<br>เฉพาะที่ปลายยอด<br>: 2 สัปดาห์ต่อมา<br>ใบร่วงที่ปลายกิ่ง<br>ช่วงแผลมีลักษณะแห้ง | ปกติ | ปกติ เริ่มให้ผล | : พืชแสดงอาการใบเหลืองส้ม<br>มียางไหล ใบร่วง ผลร่วงเหลือ<br>2-3 ผล จึงทริตยาอีกครั้ง<br>: 2 สัปดาห์ต่อมาดีขึ้น ใบไม่ร่วง<br>: 1 เดือน ไม่ปรากฏโรคมากขึ้น<br>แต่เปลือกลำต้นล่อน | ปกติ แต่ไม่สมบูรณ์<br>ไม่มีการสร้างเปลือก<br>ลำต้นได้ | โค่นทิ้ง |

**ตารางที่ 9** การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสารร่วมกับ Foli-R-Fos 400 (ต่อ)

| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Oxytetra. D6 | : แสดงอาการระดับ 3 :2 สัปดาห์ต่อมา ใบร่วงเกือบหมดต้น ยังปรากฏยางไหลที่ลำต้น :1 เดือน ผลิใบอ่อน เปลือกลำต้นแห้งและแตก : 2 เดือน ผลิใบมากขึ้น | สมบูรณ์ ปกติ :เดือนที่ 4 ปรากฏอาการยางไหลที่ลำต้น ต่อมาใบเหลือง ร่วง ตาย | | | | |
| Streptomycin G24 | แสดงอาการโรคระดับ 3 ตัดกิ่งที่เป็นโรค กิ่งที่เหลือไม่สมบูรณ์ มียางไหลเล็กน้อย | กิ่งที่เหลือไม่ค่อยสมบูรณ์ รูที่เจาะสำหรับทรีตยามีลักษณะฉ่ำน้ำ | โค่น | | | |

**ตารางที่ 9** การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสารร่วมกับ Foli-R-Fos 400 (ต่อ)

| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Streptomycin G56 | แสดงอาการโรคระดับ 3 ใบเหลือง ร่วง ผลร่วง 1 เดือนต่อมา ใบร่วงเหลือ 40% ผลที่เหลือบิดเบี้ยว | ใบสีเขียวเข้ม ผลิใบเพิ่มมากขึ้น เป็น 50% | แตกกิ่งก้านเพิ่มมากขึ้น | เจริญสมบูรณ์ดี | สมบูรณ์ดี | แสดงอาการโรค 1 กิ่ง |
| G108 | แสดงอาการโรคระดับ 1 ใบร่วงเหลือใบ 35% | เจริญสมบูรณ์ดีขึ้น | เจริญปกติ มีกิ่งผุ ตัดทิ้ง | สมบูรณ์ดี | แสดงอาการโรค 1 กิ่ง ตัดทิ้ง | ปกติไม่ให้ผลผลิต |
| Dexan G117 | เป็นโรคระดับ 3 | เริ่มแตกใบมากขึ้น แต่ไม่สมบูรณ์ | ใบเขียวหม่นไม่สมบูรณ์ เปลือกลำต้นแตก | ต้นไม่สมบูรณ์ ใบร่วง เจ้าของโค่นทิ้ง | | |
| G79 | พืชแสดงอาการโรคระดับ 3 เป็นโรค 1 กิ่งใหญ่ ใบและ ผลร่วงจนหมด 1 กิ่ง | กิ่งที่แสดงอาการโรคนั้นแห้งตาย ทั้ง 2 กิ่ง ใบเหลือ 30% ของต้นปกติ | ใบที่เหลือไม่แตกต่างจาก 3 เดือนที่ผ่านมา | เจ้าของโค่นทิ้ง | | |

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวินทรีย์ร่วมกับ Foli-R-Fos 400 (ต่อ)

| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Dexan<br>G32 | : แสดงอาการโรคระดับ 3 ใบมีสีเหลืองส้ม พบเพียงกิ่งเดียว<br>: 1 เดือนต่อมา แสดงอาการโรคเพิ่มอีก 1 กิ่ง ยางไหลทั้งต้น | : ใบร่วงเกือบหมดต้น มากขึ้น เป็น 50%<br>:ตาย | | | | |
| Foli-R<br>G22 | แสดงอาการโรคระดับ 3 ถึง 4 ใบมียางไหล ใบเหลือง ร่วงทั้งต้น แต่เปลือกลำต้นไม่แตก<br>: 1 เดือนต่อมาใบร่วงเกือบหมด เหลือประปราย ในแต่ละกิ่งประมาณ 10% ใบเขียวหม่น ไม่เป็นมัน<br>: 2 เดือน ใบเขียวหม่นขนาดเล็ก | พืชแตกใบใหม่เล็กน้อย แต่โดยทั่วไปไม่ดีขึ้น | โค่น | | | |

ตารางที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสารร่วมกับ Foli-R-Fos 400 (ต่อ)

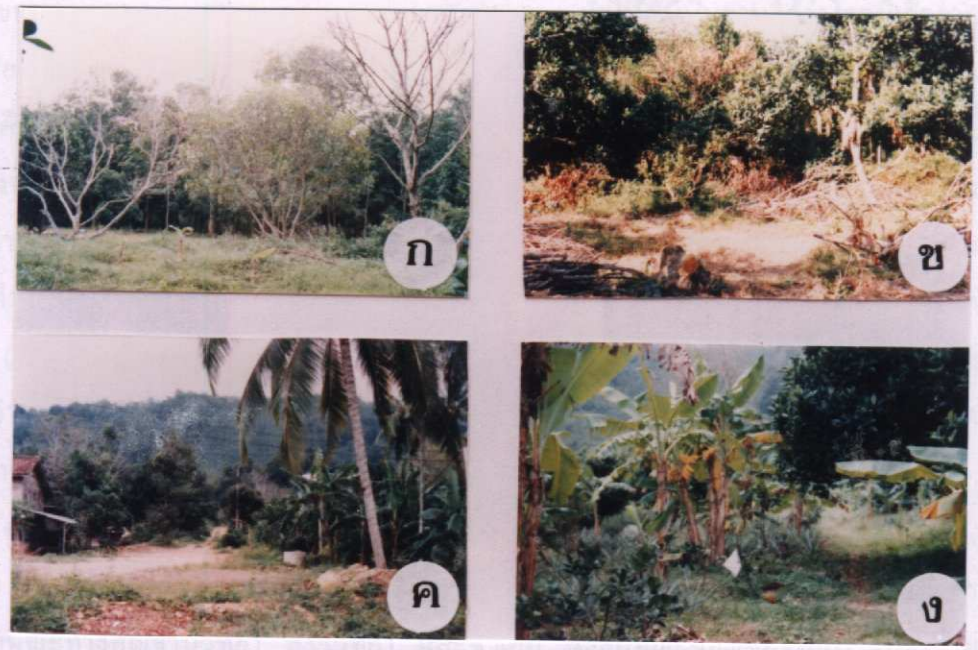
| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Foli-R G61 | : แสดงอาการโรคระดับ 3 หลังทรีตยาแล้วไม่ดีขึ้น จึงตัดกิ่งที่เป็นโรค | หลังทรีต ต้นปกติ :เดือนที่ 4 เกิดโรคที่ลำต้น มียางไหล ใบร่วง :เดือนที่ 5 ใบร่วง เปลือกแตก ใบเหลือ 30% | ตัดลำต้น | แตกใบใหม่ ใบสมบูรณ์ดี | โค่น | |
| G 69 | : แสดงอาการโรคระดับ 3 เชื้อเข้าที่ลำต้น ใบเหลือง ทั้งต้น : 1 เดือนต่อมาทั้งต้น ใบร่วงเหลือประมาณ 5% | เปลือกของลำต้นมีลักษณะล่อน ใบเพิ่มขึ้นเล็กน้อย | ต้นปกติ มีใบเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ประมาณ 10% | ต้นปกติ | ให้ผลผลิต | ให้ผลผลิตเล็กน้อย |
| Foli-R+Oxy. G107 | : เป็นโรครุนแรงระดับ 3 ใบร่วง เหลือใบประมาณ 30% บางกิ่งใบร่วงหมด | ดีขึ้น ใบเขียวเข้ม มีใบมากขึ้น | ปกติ | ปกติ | ปกติ | มีเชื้อเข้าทำลาย 2 กิ่ง ไม่เข้าลำต้น ตัดแล้วดีขึ้น |
| G94 | : เกิดโรคที่กิ่งใหญ่ 3 กิ่ง ลำต้นเริ่มมียางขาว ตัดกิ่งที่เป็นโรค และทรีตยา | ใบร่วงหมดทั้งต้น | โค่น | | | |

**ตารางที่ 9** การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสารร่วมกับ Foli-R-Fos 400 (ต่อ)

| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Foli-R+Oxy.<br>G29 | : แสดงอาการโรคระดับ 3<br>: 2 เดือน มี 1 กิ่ง ใบเขียวหม่น บางกิ่งตาย โคนต้นมีลักษณะเปลือกล่อน | ใบเหลืองหม่น<br>ปกติ | โล่น | | | |
| Foli-R+Strep.<br>G35 | แสดงอาการโรคมาแล้ว<br>2 เดือน มี 1 กิ่งมีใบเหลืองส้ม แต่ไม่พบยางไหล | ใบเขียวเข้มดี<br>เจริญตามปกติ<br>พืชแตกใบใหม่เล็กน้อย | เจริญปกติ | เจริญปกติ | เจริญปกติ | เจริญปกติ<br>หลังติดเชื้อ เป็นโรค 1 กิ่ง ตัดทิ้ง |
| G57 | : แสดงอาการโรคระดับ 2<br>ใบเริ่มมีสีเหลืองส้ม<br>มียางไหล 1-2 หยด<br>: 1 เดือนต่อมา ใบร่วงเหลือใบประมาณ 10% | ใบร่วงเกือบหมด<br>และเริ่มผลิใบใหม่ | ตัดเหลือลำต้นสูง 1 เมตร | มีกิ่งใหม่ 1 กิ่ง | โล่น | |
| G101 | :แสดงอาการโรคระดับ 3<br>ใบร่วง<br>: | เริ่มผลิใบใหม่มีผล 1 ผล | ผลร่วง<br>ใบสมบูรณ์ | เจริญตามปกติ | เชื้อเข้าทำลาย 1 กิ่ง<br>ไม่ตาย | เจริญตามปกติ |

**ตารางที่ 9** การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิชีวนสารร่วมกับ Foli-R-Fos 400 (ต่อ)

| สารเคมีที่ใช้ | อาการเริ่มต้น | 3 เดือน | 6 เดือน | 9 เดือน | 12 เดือน | 15 เดือน |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Foli-R+Dexa. G116 | : แสดงอาการโรคระดับ 3 อาการดีขึ้นแล้ว มีใบประมาณ 70% | ใบสมบูรณ์ดี เขียวเข้ม เริ่มให้ผลผลิต | มีเชื้อเข้าทำลาย เกิดโรค ฉีดยาซ้ำ | เจริญดี | เจริญปกติ | เจริญปกติ |
| G51 | เป็นโรคระดับ 3 ใบร่วง เหลือประมาณ 40% 2 เดือน มี 1 กิ่งมีใบเหลืองส้ม แต่ไม่พบยางไหล | ใบสมบูรณ์ เขียวเข้ม ลำต้นผุ เดือนที่ 5 ตัดลำต้น เหลือลำต้นสูง 1 เมตร พืชแตกใบใหม่เล็กน้อย | แตกกิ่งก้านใหม่ สมบูรณ์ดี | เจริญปกติ | เจริญสมบูรณ์ดี | เจริญสมบูรณ์ดี แต่ไม่ให้ผลผลิต หลังจากนั้น 2 ปี โค่นทิ้งเพื่อทำถนน |
| G119 | : แสดงอาการโรคระดับ 3 ใบร่วง : 2 เดือนเริ่มผลิใบอ่อน | ผลิใบอ่อนมากขึ้น และเริ่มผลิใบใหม่ | ปกติ | ปกติ | แสดงอาการโรค ตาย | |




**รูปที่ 10** ต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายและสภาพสวนที่เปลี่ยนแปลง

ก. ส่วนหนึ่งของต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย

ข. ลดการระบาดของโรคโดยการตัดและเผา

ค. ตลอดแนวถนนลูกรังเคยปลูกจำปาดะขนุน

ง. ลดการระบาดของโรคโดยเปลี่ยนพืชปลุกหรือพืชแซม

# สรุปผลและวิจารณ์

จากเชื้อบริสุทธิ์ชนิดเดียวกันจำนวนมากที่แยกได้จากจำปาดะขนุนที่แสดงอาการโรค ทุกตัวอย่างโรค รวมทั้งการศึกษาเนื้อเยื่อตรวจพบแบคทีเรียหรือกลุ่มของแบคทีเรียจำนวนมาก ในส่วนของ phloem fiber ของ ray parenchyma ทำให้สันนิษฐานได้ว่าโรคนี้เกิดจาก แบคทีเรีย เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค บนต้นจำปาดะขนุนทั้งบนกิ่ง อายุ 3 เดือน และต้นที่มีอายุประมาณ 12 ปี พบว่าพืชแสดงอาการของโรคไม่เด่นชัดนัก ทั้งนี้ อาจเนื่องจากวิธีการปลูกเชื้อที่ไม่เหมาะสม สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรืออื่นๆ รวมทั้งใน ขณะที่ทำแผลปลูกเชื้อพบว่ามียาง (latex) ไหลออกมาจากแผลนั้น ยางนี้อาจมีผลทำให้ปิดกั้น การเข้าทำลายของเชื้อ หรือทำให้เชื้อเข้าทำลายไม่สะดวก อันเป็นกลไกหนึ่งเพื่อการอยู่รอด ของพืช (Agrios, 1978) อย่างไรก็ตามจากลักษณะแผลที่เกิดมีแนวโน้มว่าเชื้อสามารถทำให้เกิด โรคกับจำปาดะขนุนได้ แต่จำเป็นต้องอาศัยเวลาในการพัฒนาการเกิดโรค และปรับสภาพแวด ล้อมให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า อาการของโรคนี้คล้ายคลึงกับที่พบกับขนุนและจำปาดะใน มาเลเซีย (Lim and Yasin, 1983) และพบกับ walnut (Wilson, et al., 1957) จึงได้ทำการ ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ซึ่งลักษณะของเชื้อจากการศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและลำแสงผ่าน พบว่าแบคทีเรียมีรูปร่างเป็นท่อน ขนาด 0.72-0.78x2.9-4.7 ไมครอนมักอยู่เดี่ยวๆ เคลื่อนไหวได้ด้วย flagella 4-5 เส้นแบบรอบ ตัว ลักษณะโคโลนีกลม ผิวหน้านูนเป็นมัน ขอบเรียบ สีขาวโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 1 มิลลิเมตร gram negative เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนไม่สร้างสปอร์ และอื่นๆ ดังสรุปในตารางที่ 2 ซึ่งจำแนกได้ว่าเชื้อตัวนี้จัดอยู่ใน genus Erwinia

Lim และ Yasin (1983) รายงานว่า branch die -back disease ของจำปาดะและขนุน เกิดจากเชื้อErwinia carotovora var carotovora ซึ่งเป็นเชื้อที่จัดอยู่ใน carotovora group เชื้อ ในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นคือสามารถทำให้มันฝรั่งเน่า และสามารถย่อยได้ภายใน 1 สัปดาห์ แต่ จากการศึกษาโดยใช้เชื้อจากจำปาดะขนุนพบว่า ไม่สามารถทำให้มันฝรั่งเน่า และไม่ย่อย gelatin ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เชื้อที่แยกได้จากจำปาดะขนุนทั้ง 8 isolates นั้นแตกต่างแตกต่าง

จากเชื้อสาเหตุที่รายงานโดย Lim และ Yasin (1983) และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบ กับเชื้อ E. rubrifaciens, E. quercina, E. salicis และ E. nigrifluens ใน amylovora group ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกับไม้ยืนต้นได้ พบว่านอกเหนือจากลักษณะหลายประการที่คล้ายคลึงกันในทั้ง 4 species แล้ว เชื้อที่แยกจากจำปาดะขนุนยังมีคุณสมบัติเหมือนกับ E. nigrifluens คือสามารถสร้างเอนไซม์ urease เพื่อย่อยสลายยูเรียที่ประกอบอยู่ในอาหารทดสอบได้ ไม่สามารถสร้างเม็ดสีสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YDC สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อแม้ไม่มีอินทรียสารเป็นองค์ประกอบ เจริญเติบโตและให้โคโลนีสีเหลืองส้มบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MS ในขณะที่ E. rubrifaciens สร้างเม็ดสีสีชมพูบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YDC เชื้อ E. quercina ต้องการอินทรียสารในการเจริญเติบโต E.salicis ไม่ให้โคโลนีสีเหลืองส้มบนอาหาร MS และทั้งสาม species หลังนี้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ urease เพื่อย่อยสลายสารประกอบยูเรียได้ จึงเห็นได้ว่าเชื้อที่แยกจากจำปาดะขนุนนี้มีคุณสมบัติสอดคล้องกับเชื้อ E. nigrifluens ดังกล่าวข้างต้น

นอกจากนี้เชื้อทั้ง 8 isolates สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พร้อมทั้งสร้างกรดจาก aesculin, cellobios, glycerol, inositol, lactose, manitol, raffinose, rhamnose, ribose, salicin, trehalose, และ xylose ไม่สร้างกรดจาก adonitol, dulcitol, melibiose,sorbitol alpha-methylglucoside, และ starch สามารถใช้ sodium tartrate และไม่ใช้ sodium citrate, sodium galacturonate เป็นสารประกอบอินทรีย์ในการเจริญเติบโต ซึ่งลักษณะทั้งหมดนี้เหมือนกับ E. nigrifluens ซึ่งบรรยายไว้โดย Fahy และPersley (1983) และ Schaad (1986) จึงสรุปว่าเชื้อที่แยกได้นี้คือ Erwinia nigrifluens

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในห้องปฏิบัติการครั้งที่ 1 พบว่า Tetracycline และ Dexan มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของ E. nigrifluens ส่วน Streptomycin มีแนวโน้มว่าจะใช้ได้ จึงนำมาใช้ในสวนเกษตรกร โดยการฉีดสารเคมีเข้าลำต้น แต่ไม่ได้ผล ซึ่งอาจเนื่องจากพืชแสดงอาการรุนแรงมากแล้ว หรือสารเคมีไม่มีประสิทธิภาพจึงได้ทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยครั้งหลังนี้เปลี่ยนจาก Tetracycline เป็น Oxytetraclcline ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่า และได้จัดลักษณะเป็นโครงการให้เกษตรกรฉีดสารเคมีด้วยตนเองทันทีที่พบว่ามีอาการโรค หรือมียางสีขาวที่กิ่งใดกิ่งหนึ่ง เป็นการรักษาในระยะเริ่มต้น โดยการสุ่มสารเคมีให้ไว้แก่เกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ ซึ่งจากการทรีตสารเคมีและศึกษาลักษณะอาการของ

พืชจนถึง 1 มิถุนายน 2536 พบว่าจำปาดะขนุนเป็นโรคจำนวน 15 ต้น และขนุนเป็นโรค 12 ต้น เกษตรกรได้ทำการทรีตยาตามที่ได้รับมอบหมายไว้เป็นระยะทุกสัปดาห์ และตรวจผลทุก สัปดาห์พบว่า จำปาดะขนุนซึ่งทรีตด้วย Oxytetracycline จำนวน 15 ต้น มีอาการดีขึ้น 9 ต้น (+6/15) ตายไป 6 ต้น (-6/15) คิดเป็น 60 และ 40% ตามลำดับ บางสวนไม่มีการแพร่ระบาดของโรค จึงไม่มีการทรีตสารเคมี

ต้นที่มีอาการดีขึ้นสภาพทั่วไปใบเป็นสีเขียวเข้ม ผลิใบใหม่ เมื่อปาดดูเนื้อเยื่อใต้บริเวณที่เป็นโรค cambium และ cork cambium มีสีน้ำตาลอ่อน มีลักษณะแห้งแตกต่างจากขณะที่เป็นโรค อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อส่วนนี้ ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ต่อไป สำหรับ 6 ต้นที่แห้งตายนั้น จำปาดะขนุน 2 ต้นที่แห้งตายหลังจากการทรีตยาครั้งที่สอง ส่วนอีก 4 ต้นแห้งตายหลังจากการทรีตยาครั้งที่สาม เป็นความบังเอิญที่การทรีตยาทั้งหมดกับจำปาดะขนุนเป็นสารชนิดเดียวกัน คือ Oxytetracycline จึงไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารเคมีชนิดอื่น

ส่วนขนุนเป็นโรค 12 ต้น ทรีตด้วย Oxytetracycline, Dexan, และ Dexan+Tetracycline โดยทำการฉีดเข้าลำต้นขนุนจำนวน 9, 2, และ 1 ตามลำดับ ปรากฏว่า ต้นขนุนซึ่งทรีตด้วย Oxytetracycline มีอาการดีขึ้น ทั้ง 9 ต้น ผลิใบและให้ผลผลิต (+9/9) ซึ่งบางต้นที่ถูกเชื้อรา ทำลายเร็วมาก ต้นค่อนข้างโทรม ต้องบำรุงดูแลรักษาอย่างดี ต้นที่ทรีตด้วย Dexan ตายทั้ง 2 ต้น (-2/2) ส่วนขนุน 1 ต้นที่ทรีตด้วย Dexan+Oxytetracycline ไม่ตาย (+1/1) แต่ต้นทรุดโทรมค่อนข้างมาก เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารพบว่า Oxytetracycline มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อค่อนข้างดีกว่าสารเคมีชนิดอื่น แต่สรุปไม่ได้ว่าเป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด

ในขั้นตอนในการทรีตสารเคมีในสวนเกษตรกรมีอุปสรรคค่อนข้างมากที่สำคัญประการหนึ่งคือ เกษตรกรไม่ได้ทรีตสารเคมีในระยะเริ่มต้นของโรคจริงๆ บางครั้งทรีตในระยะ 2, 3 หรือแสดงอาการโรคเด่นชัดแล้ว มีน้ำยางไหลสีน้ำตาล ใบเหลืองส้ม ผลร่วง ซึ่งจัดเป็นอาการขั้นสุดท้าย เนื่องจากแบคทีเรียเข้าไปเจริญอุดตัน vascular tissue การเคลื่อนที่ของน้ำและอาหารเป็นไปได้ยากลำบาก ในระยะนี้แม้สารเคมีจะมี ประสิทธิภาพเพียงไร ก็ไม่สามารถรักษาให้หายได้ เกษตรกรหลายรายกล่าวว่า ได้พยายามดูแลอย่างใกล้ชิดทุกวันแต่วินิจฉัยยากมาก การทรีตสารเคมีจึงช้าไป

ในการทดลองนี้ผู้วิจัยไม่สามารถจัดวางแผนการทดลองทางสถิติได้เนื่องจากการเกิดโรคมิได้เกิดระยะเวลาเดียวกันความสม่ำเสมอในตัวเกษตรกรไม่เท่ากัน การทดสอบจึงตรวจผลว่า ต้นพืชหายจากโรคและผลิใบได้ตามปกติหรือไม่ กล่าวโดยสรุป การอบรมเชิงปฏิบัติการนี้เกษตรกรได้เรียนรู้เทคนิคการฉีดยาเข้าลำต้นพืช ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีได้ผลดีในระดับหนึ่ง แต่ยังไม่เป็นที่พอใจนัก

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ E. nigrifluens ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตร EMB 12 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อ NA และ MS พบว่าการเจริญของเชื้อนี้บนอาหารที่ดัดแปลงจาก EMB สูตรต่างๆ แตกต่างจากที่เจริญบน NA และ MS ทั้งลักษณะจำนวน
และขนาดของ โคโลนี บน EMB มีความจำเพาะของการแสดงลักษณะโคโลนี ได้แก่การสร้าง slime เม็ดสี และการสร้าง metallic sheen ซึ่งบน NA และ MS ไม่มีลักษณะเฉพาะเหล่านี้ ในอาหาร NA เชื้อแบคทีเรีย E. nigrifluens มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ มีสีขาว และสร้าง slime มาก ส่วนบน MS มีโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ มี slime น้อย เปลี่ยนสีอาหารจากสีน้ำเงินอมเขียวเป็นสีเหลือง

ซึ่งลักษณะดังกล่าวใกล้เคียงกับลักษณะของ E. nigrifluens แต่การแสดงลักษณะของเชื้อนี้บน EMB Mod. 1-6 มีลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ สร้าง slime มาก สร้างเม็ดสีสีม่วง และสร้าง metallic sheen มาก ส่วน EMB Mod.7-12 มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ มี slime น้อย สร้างเม็ดสีสีส้มแดง และการสร้าง metallic sheen น้อย ข้อที่ได้เปรียบอีกประการหนึ่งคือ E. nigrifluens สามารถเจริญได้รวดเร็วบน EMB ภายใน 24 -48 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้ออื่นใช้เวลา 48-72 ชั่วโมง

สำหรับประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลของเชื้อ E. nigrifluens บนสูตรอาหาร EMB Mod. 1-12 เมื่อวิเคราะห์ที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี และขนาดของโคโลนี พบว่า ในอาหาร EMB Mod. 2 ซึ่งมี sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้มากที่สุด คือ มีจำนวน $1.76x10^{8}$ เซลล์/มล. และมีขนาดโคโลนี 3.59 มม. นอกจากนี้การแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็ชัดเจนว่ามีการสร้าง slime และ metallic sheen มากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น

ในการทดสอบประสิทธิภาพของอาหารโดยแยกเชื้อจากดิน ซึ่งมีชิ้นส่วนของพืชที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับการทดสอบประสิทธิภาพอาหารกับเชื้อ E. nigrifluens ที่พิสูจน์แล้วให้ผล

ไปในทางเดียวกันคือ จากการวิเคราะห์ทางสถิติ อาหารทั้ง 14 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % ของจำนวนโคโลนี และขนาดโคโลนี เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ของจำนวนของขนาดของโคโลนี EMB Mod. 2 ซึ่งมีจำนวน $1.76x10^8$ เซลล์/มล และขนาดโคโลนี 3.59 มม.จากเชื้อ E. nigrifluens ที่ผ่านการพิสูจน์แล้ว ส่วนเชื้อที่แยกจากดินตัวอย่าง มีจำนวน $7.05x10^6$ เซลล์/มล และขนาดโคโลนี 4.14 มิลิลเมตร มีการเจริญดี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อบน EMB Mod .2 ชัดเจนกว่าสูตรอื่นๆ คือมีการสร้าง slime และ metallic sheen มากกว่า

ฉะนั้นอาหาร EMB Mod .2 ซึ่งประกอบด้วย sucrose, eosin Y, methylene blue, cyclohexamide, $K_2HPO_4$ และ agar เหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารที่ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อ E. nigrifluens จากเชื้ออื่น เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ โดยเชื้อจะแสดงลักษณะ กลมนูน ขอบเรียบ ผิวมัน ขนาดประมาณ 4 มม. มี slime มาก สร้างเม็ดสีสีม่วง และมีการสร้าง metallic sheen มากบนโคโลนี

จากการสำรวจการระบาดของโรค โดยเน้นเฉพาะเจาะจงที่สวนนายกริ้ม สินธุรัตน์ ซึ่งปลูกจำปาดะขนุนมากถึง 126 ต้น เป็นต้นที่ให้ผลผลิต และเป็นสวนที่มีการระบาดมากที่สุด พบต้นที่เป็นโรคในเกือบทุกๆ เดือนที่สำรวจ ช่วงที่มีการระบาดและทำให้พืชแสดงอาการโรคมากคือในเดือน มีนาคม ปี พ.ศ. 2533 และเดือน เมษายน ปี พ.ศ. 2534 และ ปี พ.ศ .2535 โดยมีจำนวนต้นที่เป็นโรคถึง 9, 24 และ 22 ต้น ตามลำดับ และที่น่าสังเกตคือ จำนวนต้นตายระหว่างเดือนมกราคม ถึง เมษายน 2535 จำปาดะขนุนตายไปจำนวน 12,6, 6 และ 22 ต้น ตามลำดับ รวม 46 ต้นซึ่งสูงมาก และส่วนใหญ่เป็นต้นที่แสดงอาการโรคแต่ไม่ตาย โดยอาจตายหลังแสดงอาการโรค 2-3 เดือน หรืออาจไม่ตาย ปัจจัยสำคัญประการหนึ่งคือ ระหว่างเดือนตุลาคม ถึง ธันวาคม 2534 ฝนตกชุกมากปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 105.5 มิลลิเมตร จึงเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อแพร่กระจาย และเกิดโรคมากในช่วงต้นปี 2535

ส่วนการสำรวจแมลง พบแมลงจำนวน 67 ชนิดโดยแต่ละครั้งพบแมลง 4-13 ชนิด โดยชนิดและจำนวนแตกต่างกันออกไป และเมื่อทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์เพื่อศึกษาการเป็นพาหะของแมลง โดยวิธี streak plate บนอาหาร EMB Mod.2 พบเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีคล้ายคลึงกับ E. nigrifluens ถึง 4 ชนิด โดยมีลักษณะกลม ผิวหน้านูน ขอบเรียบ ขนาด 2-5 มิลลิเมตร สร้าง metallic sheen และมี slime และเมื่อนำมาทดสอบเลี้ยงในอาหาร MS พบว่ามีการเปลี่ยน

สีของ bromthymol blue จากสีน้ำเงินอมเขียว (greenish blue) เป็นสีเหลือง มีขนาดโคโลนี 1-1.5 มิลลิเมตร กลม ขอบเรียบ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ทำให้ไม่สามารถจำแนกเชื้อ E. nigrifluens ที่อาจติดมาได้ ต้องทำการแยกชนิดตามวิธีการในข้อ 4 จึงได้เก็บรักษาเชื้อไว้ในหลอดทดลอง เพื่อทดสอบต่อไป แต่เนื่องจากเกิดการผิดพลาดในการ sub-culture และเก็บรักษา เชื้อจึงแห้งตาย จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า แบคทีเรียที่แยกออกจากแมลงนั้นคือ E. nigrifluens ซึ่งเป็นสาเหตุโรคนี้หรือไม่

แมลงที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae โดยมีความถี่หรือจำนวนครั้งที่พบเชื้อมากกว่า 10 ครั้งได้แก่ ด้วงกุหลาบ เพลี้ยกระโดด เพลี้ยจั๊กจั่น ด้วงรา และด้วงน้ำ และเมื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ของปริมาณแมลงที่มีเชื้อที่สงสัยใน 1 เดือน หรือ 1 ถึง 5 เดือนก่อนการเกิดโรคกับการระบาดของโรค ปรากฏว่า ไม่สามารถหาความสัมพันธ์ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากแมลงเหล่านั้นไม่ใช่พาหะของโรค และไม่มี incubation period ที่แน่นอนของโรคนี้ สำหรับแมลงที่เกษตรกรเชื่อว่าน่าจะเป็นพาหะของโรคนี้คือ ด้วงหนวดยาว (long-horned beetle) แม้จะเป็นแมลงชนิดปากกัดแต่สำรวจพบเพียง 3 ตัวในระยะเวลาต่างๆ กันจึงไม่น่าจะเป็นพาหะที่สำคัญของโรคนี้ นอกจากนั้นอาจมีสัตว์ชนิดอื่น เช่น นก เป็นพาหะนำเชื้อไปได้ Wilson (1957) สรุปว่านอกเหนือจากเครื่องมือในการเก็บเกี่ยวที่เป็นปัจจัยหลักในการแพร่โรค bark canker ซึ่งเกิดจากเชื้อ E. nigrifluens กับ walnut แล้ว sap sucking bird ก็มีส่วนในการแพร่โรคด้วยเช่นกัน Breclj (1997) ได้ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ E. amylovora ที่ติดไปกับนกกระจอก พบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 9 วัน และในระยะเวลา 9 วันนี้นกสามารถบินได้ไกลถึง 540 กิโลเมตรหรือมากกว่า จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โรคนี้ระบาดไปได้ไกล

จากลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏยางสีขาวและกลุ่มของแบคทีเรียไหลปนกับน้ำออกมาจากลำต้น เมื่อแมลงเดินบนลำต้น เชื้ออาจติดไปกับขาได้ หรือหากแมลงกัดกินต้นเป็นโรคแล้วไปกัดกินต้นปกติก็จะเป็นการแพร่เชื้ออย่างทั่วไปไม่จำเพาะเจาะจงได้ สมควรที่จะมีการศึกษาความเป็นไปได้ต่อไป โดยศึกษาการติดไปบนอวัยวะบางส่วนของแมลง เช่นปากและขา ซึ่งอาจให้คำตอบที่ชัดเจนกว่านี้

สำหรับการควบคุมโรคโดยวิธีผสมผสาน หรือวิธีบูรณภาพนั้น ได้ดำเนินโดยใช้สารเคมี และวิธีการทางเขตกรรม สำหรับสารเคมีที่ใช้มี 2 ประเภทคือ สารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหรือฆ่าเชื้อ ซึ่งจากการทดสอบที่ผ่านมา ได้แก่ Oxytetracycline, Streptomycin และ

Dexan สารเคมีอีกชนิดหนึ่งคือ สารที่มีรายงานว่าเพิ่มความแข็งแรงและอาจเพิ่มความต้านทานโรคให้กับพืช คือ Foli-R-fos 400 ส่วนการปฏิบัติการทางเขตกรรม ใช้วิธีตัดแต่งกิ่งที่เป็นโรคและเผาทำลายทันที เนื่องจากเมื่อพืชแสดงอาการโรค ลักษณะเด่นประการหนึ่งของโรคนี้คือมีกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญใน vascular system ถูกขับออกมาที่ผิวเปลือก และไหลเป็นทาง เมื่อฝนตกสามารถติดไปกับน้ำฝน กระเด็นไป หรือถูกพัดพาไปกับพายุฝน แพร่กระจายไปได้ การเผาทำลายหรือลดปริมาณเชื้อจึงเป็นส่วนสำคัญประการหนึ่ง ในการลดการระบาดของโรค

จากการทดสอบการใช้ปฏิชีวนสารอย่างเดี่ยวๆ Foli-R-Fos 400 ชนิดเดียวหรือใช้ผสมร่วมกันได้แก่ Foli-R-Fos 400+Oxytetracycline, Foli-R-Fos 400+Streptomycin, Foli-R-Fos 400+Dexan และติดตามบันทึกอาการของต้นที่ทำการทรีตยาทุก 1 หรือ 2 สัปดาห์ พบว่า ในทุกทรีตเม็นต์ที่ทำการทดลอง มีต้นที่มีอาการดีขึ้นในระยะแรก หลังจากนั้น 6 หรือ 9 เดือนพืชแสดงอาการโรคอีกครั้ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากยังมีเชื้อหลงเหลือที่ลำต้นหรือกิ่ง ค่อยๆ เพิ่มปริมาณทำลายพืชจนพืชแสดงอาการโรคอีกครั้ง หรืออาจเป็นเชื้อที่แพร่ระบาดจากต้นอื่นและเข้าทำลาย พืชจึงแสดงอาการโรคโดยไม่สัมพันธ์กับการเกิดโรคครั้งแรก ในการเกิดโรคครั้งที่ 2 นั้นมักจะรุนแรงกว่าในครั้งแรก และทำให้จำปาดะขนุนตาย หรือใบร่วงจนเหลือเพียง 5-10 เปอร์เซ็นต์ของที่เคยมี เจ้าของจึงโค่นทิ้ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากหลังการเกิดโรคครั้งแรกพืชทรุดโทรมและอ่อนแอ การเคลื่อนที่ของน้ำและอาหารไม่สม่ำเสมอ ต้นไม่สมบูรณ์ เมื่อมีเชื้อทำลายอีกครั้งจึงรุนแรงกว่าครั้งแรก

สำหรับต้นที่ไม่ถูกเชื้อเข้าทำลาย หรือแสดงอาการโรคอีกเป็นครั้งที่ 2 ต้นไม่สมบูรณ์เป็นปกติเหมือนก่อนถูกเชื้อเข้าทำลาย ต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายที่กิ่ง แม้จะเกิดหลายกิ่งใหญ่พร้อมๆ กัน โอกาสที่จะเจริญเป็นปกติมีมากกว่าต้นที่ถูกเชื้อเข้าทำลายที่ลำต้น จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ดูเหมือนว่าทรีตเม็นต์นั้นๆ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคดีกว่าชนิดอื่นๆ และผู้วิจัยไม่สามารถวินิจฉัยได้ว่า การเข้าทำลายนั้นๆ เข้าทำลายที่กิ่งหรือที่ลำต้น นอกจากต้องสุ่มถากเปลือกของลำต้นเป็นจุดๆ ซึ่งในทางปฏิบัติเจ้าของสวนมักไม่ยินยอมเนื่องจากเกรงว่าจะทำให้เกิดรอยแผลมากขึ้น

จากการทดลองทั้งหมด 21 ต้นและติดตามผลเป็นเวลา 15 เดือน พบว่าต้นที่ไม่แสดงอาการโรคครั้งที่ 2 และสามารถให้ผลผลิตได้ แม้ว่าต้นไม่สมบูรณ์ดังเดิมมีจำนวน 4 ต้น คือต้นที่ทรีตด้วย Foli-R-Fos 400, Foli-R-Fos 400+Streptomycin, Foli-R-Fos 400+Dexan และ

Foli-R-Fos 400+Oxytetracycline เป็นที่น่าสังเกตว่าทุกต้นเป็นการทรีตผสมระหว่างปฏิชีวนสารกับ Foli-R-Fos 400 จึงน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับวิธีการทางเขตกรรมอื่นๆ แม้ว่าแต่ละทรีตเม็นต์นั้นรอดเพียง 1 ต้นจากที่ทรีต 3 ต้น และการที่ไม่ตาย และให้ผลผลิตอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ที่กล่าวข้างต้น

และควรใช้สลับกันระหว่างปฏิชีวนสารทั้ง 3 ชนิดนี้ Manulis และ คณะ (1998) รายงานว่าเชื้อ E. amylovora ซึ่งจัดอยู่ใน amylovora group เช่นเดียวกับ E. nigrifluens นั้น ต้านทานต่อ Streptomycin ค่อนข้างเร็ว ทำให้การกำจัดโรค fire blight ไม่ได้ผลใน Israel แต่สายพันธุ์ที่ต้านทานนั้นไม่สามารถถ่ายทอดยีนที่ต้านทานไปยังสายพันธุ์ที่อ่อนแอได้ ข้อควรสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ในการทดลองควบคุมโรคโดยวิธีบูรณภาพนั้นเป็นช่วงที่มีฝนตกชุก มีการระบาดของโรครุนแรงและเร็วมาก จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้จำนวนต้นรอดตายน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองใช้สารเคมีเดี่ยวๆ ในแปลงเกษตรกร

กล่าวโดยสรุป ในการควบคุมโรคต้นแห้งตายของพืชสกุลขนุนนี้ ควรดำเนินการ โดยใช้สารเคมีทั้ง 2 ประเภทคือปฏิชีวนสารและสารเสริม Foli-R-Fos 400 ควบคู่กับการปฏิบัติทางเขตกรรม คือตัดและเผาต้นที่เป็นโรคเพื่อลดปริมาณเชื้อ และสังเกตพืชอย่างสม่ำเสมอ หากพบพืชเป็นโรคระยะแรก โอกาสในการรักษาให้หายมีมากกว่าการรักษาเมื่อเชื้อเข้าทำลายรุนแรง

# เอกสารอ้างอิง

1. ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2532 .การใช้สารดูดซึมกับโรคราชั้นต่ำ และเทคนิคโรคพืช ม.ก. การประชุมสัมมนาวิทยาการอารักขาพืชทันสมัย.สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย บางเขน กรุงเทพมหานคร 131 หน้า

2. บุญส่ง ยี่รัญศิริ .2531. ไปดูขนุนพันธุ์ดีภาคใต้และขนุนพันธุ์ยักษ์ที่ จ .สงขลา เคหเกษตร 141: 114-119

3. เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันณ์ เพชรรัตน์ วัลลภา กฤษณีไพบูลย์ มานะ กาญจนมณีเสถียร สุทธิรักษ์ แซ่หลิม และบรรหาร วิสมิตะนันท์. 2532.โรคต้นแห้งตายของจำปาดะขนุน (Artocarpus integer (Thumb), Merr.) และแนวทางในการป้องกันกำจัดเบื้องต้น.รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่. 13 หน้า.

4.สำนักงานเกษตร จังหวัดสงขลา. 2532 .รายงานความเสียหายพืชตระกูลขนุนที่เป็นโรคแห้งตาย (เอกสารประกอบการประชุม)

5. อุไรวรรณ คุณาดิลกนันท์. 2528. เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ฯ บางเขน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 65 หน้า.

6. Agrios, G.N. 1987. Plant pathology. Academic Press. New York. 703 p.

7. Beutal, J.A.,Moller, W.J., Rell, W.O., Fitch, L.B. and D.H. Chaney. 1983. Fire blight - evaluation of chemical treatment on pear. California Agriculture 27:1-16

8. Breelj, T. 1997. Bacterial blight of pears Erwinia amylovora (Burrill) Winslow et al. -it is coming to us. SAD, Revijaza-Sadjarstuo,-Vinogradnistoo-in-Vinarstoo. 8:

9. Dye, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus Erwinia. New Zealand Journal of Science. 11:690-706

10. Fahy, P.C. and G.J. Persley. 1983. Plant bacterial disease. Academic Press. New 393 p.

11. Lim. W.H.1986. Recent studies on the ecology and control of branch die-back of jack-fruit (Artocapus heterophyllus Lam.) Prosid.Simp.Buah-buahan Keb, Serdang. 272-278.

12. Lim, W.H.and I.Yasin. 1983. A new bacterial disease of jack-fruit and champedak. MAPPS Newsletter. 7(3):6-8.

13. Manulis, S., Zutra, D., Kleitman, F., Drof, O., David, I., Zilberstaine, M. and E. Shtie 1998. Distribution of Streptomycin-resistant strains of Erwinia amylovora in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. Phytoparasitica. 26:223-230.

14. Marshall, G.E., N.F.Childers and A.W.Brody. 1941. Leaf hoppers can weaken apple trees and reduce the crop .Proc.Ohio Host.Soc. 74:61-66.

15. Schaad. N. W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Department of Plant Pathology, University of Georgia. 165 pp.

16. Schaad, N. W. and E. E. Wilson. 1970. Survival of Erwinia rubrifaciens in soil. Phytopathology. 60:557-558.

17. Wilson, E. E, Starr, M. P. and J. A. Berger. 1957. Bark canker : a bacterial disease of Persian walnut tree. Phytopathology. 47:669-673.

18. Wilson, E.E., Zeitoun, F.M. and D.L. Fredricson. 1967. Bacterial phloem canker , a new disease of the Persian walnut trees. Phytopathology. 57:618-621.

19. Winstead, N.N. and A . Kelman. 1952. Inocculation techniques for evaluating resistance of Pseudomonas solanacearum. Phytopathology. 43:628-634.

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนและขนาดโคโลนีของเชื้อ E. nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| ทรีตเม็นต์ | อาหาร | จำนวนโคโลนี $\bar{X}\pm SD$(โคโลนี) | ขนาดโคโลนี $\bar{X}\pm SD$(โคโลนี) |
|---|---|---|---|
| 1 | EMB Mod.1 | 53.00±2.94 | 3.96±0.15 |
| 2 | EMB Mod.2 | 70.50±5.45 | 4.14±0.34 |
| 3 | EMB Mod.3 | 55.75± 12.92 | 3.43±0.10 |
| 4 | EMB Mod.4 | 42.75±9.88 | 5.60±0.56 |
| 5 | EMB Mod.5 | 10.00±0.00 | 3.25±0.49 |
| 6 | EMB Mod.6 | 59.00±5.16 | 4.30±0.80 |
| 7 | EMB Mod.7 | 62.50±4.04 | 2.40±0.14 |
| 8 | EMB Mod.8 | 60.75±14.35 | 1.96±0.20 |
| 9 | EMB Mod.9 | 45.25±4.03 | 1.98±0.23 |
| 10 | EMB Mod.10 | 34.00±4.69 | 1.54±0.22 |
| 11 | EMB Mod.11 | 44.00±3.16 | 1.78±0.24 |
| 12 | EMB Mod.12 | 39.00±6.78 | 2.35±0.32 |
| 13 | NA | 65.75±9.54 | 5.84±0.29 |
| 14 | MS | 45.50±10.15 | 2.81±0.09 |

**ตารางผนวกที่ 2** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ E. nigrifluens บนอาหารสูตรต่างๆ

| ทรีตเม็นต์ | ลักษณะโคโลนี | การสร้างสารเมือก | การสร้างเม็ดสี | การสร้าง MS |
|---|---|---|---|---|
| 1 | นูน | มาก | ม่วง | สร้างมาก |
| 2 | นูน | มาก | ม่วง | สร้างมาก |
| 3 | นูน | มาก | ม่วง | สร้างมาก |
| 4 | นูน | มาก | ม่วง | สร้างมาก |
| 5 | นูน | มาก | ม่วง | สร้างมาก |
| 6 | นูน | มาก | ม่วง | สร้างมาก |
| 7 | นูนมาก | ไม่สร้าง | ม่วง | สร้างน้อย |
| 8 | นูนมาก | ไม่สร้าง | ส้มแดง | สร้างน้อย |
| 9 | นูนมาก | ไม่สร้าง | ส้มแดง | สร้างน้อย |
| 10 | นูนมาก | ไม่สร้าง | ส้มแดง | สร้างน้อย |
| 11 | นูนมาก | ไม่สร้าง | ส้มแดง | สร้างน้อย |
| 12 | นูนมาก | ไม่สร้าง | ส้มแดง | สร้างน้อย |
| 13 | นูน | สร้างมาก | ขาว | ไม่สร้าง |
| 14 | นูน | สร้างน้อย | ส้มเหลือง | ไม่สร้าง |

หมายเหตุ: การสร้าง MS= การสร้าง metallic sheen

**ตารางผนวกที่ 3** วิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนโคโลนีของ E. nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 13 | 23154.3036 | 1781.1003 | 6.88** |
| Error | 42 | 10873.25 | 258.8869 | |
| Total | 55 | 34027.55 | | |

CV%=10.10%

**=Significant at 1% level

ารางผนวกที่ 4 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของขนาดโคโลนี (มม.) ของ E. nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| V | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| reatment | 13 | 65.2968304 | 5.0228331 | 86.79** |
| rror | 42 | 2.430625 | 0.578721 | |
| otal | 55 | 67.727455 | | |

V%=10.1%

*=Significant at 1% level

ารางผนวกที่ 5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีของเชื้อ E. nigrifluens ที่พิสูจน์แล้ว และที่แยกจากดิน บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| ทรีตเม็นต์ | เชื้อที่พิสูจน์แล้ว | | เชื้อที่แยกจากดิน | |
|---|---|---|---|---|
| | Ranks | Means | Ranks | Means |
| T1 | 9 | 169.25 b | 8 | 53.00 def |
| T2 | 13 | 176.75 b | 14 | 70.50 h |
| T3 | 12 | 175.50 b | 9 | 55.75 efg |
| T4 | 3 | 137.75 a | 4 | 42.75 bcd |
| T5 | 4 | 139.00 a | 1 | 10.00 a |
| T6 | 8 | 169.00 b | 10 | 59.00 fg |
| T7 | 11 | 173.50 b | 12 | 62.50 fgh |
| T8 | 14 | 180.00 b | 11 | 60.75 fgh |
| T9 | 7 | 168.25 b | 6 | 45.25 cde |
| T10 | 5 | 163.25 b | 2 | 34.00 b |
| T11 | 6 | 167.50 b | 5 | 44.00 bcd |
| T12 | 10 | 172.75 b | 3 | 39.00 gh |
| T13 | 1 | 115.75 a | 13 | 65.75 gh |
| T14 | 2 | 123.50 a | 7 | 45.50 cde |
| means | | 159.41 | | 49.13 |

ร์ยบเทียบค่าเฉลี่ยทุกปัญหาทดลองที่ระดับความแตกต่าง 5% โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 6 เปรียบเทียบค่าความแปรปรวนของขนาดโคโลนี (มม.) ของเชื้อ E. nigrifluens ที่พิสูจน์แล้ว และที่แยกจากดิน บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| Treatment | เชื้อที่พิสูจน์แล้ว | | เชื้อที่แยกจากดิน | |
|---|---|---|---|---|
| | Ranks | Means | Ranks | Means |
| T1 | 9 | 3.31 de | 10 | 3.96 f |
| T2 | 11 | 3.59 ef | 11 | 4.14 f |
| T3 | 8 | 3.04 d | 9 | 3.43 e |
| T4 | 13 | 4.07 g | 13 | 5.60 g |
| T5 | 7 | 3.25 c | 8 | 3.25 de |
| T6 | 12 | 3.83 fg | 12 | 4.30 f |
| T7 | 3 | 1.44 b | 6 | 2.40 bc |
| T8 | 4 | 1.48 b | 3 | 1.96 ab |
| T9 | 2 | 1.39 b | 4 | 1.98 ab |
| T10 | 1 | 1.00 a | 1 | 1.54 a |
| T11 | 1 | 1.00 a | 2 | 1.77 a |
| T12 | 5 | 1.70 b | 5 | 2.35 bc |
| T13 | 10 | 3.49 ef | 14 | 5.84 g |
| T14 | 6 | 1.74 b | 7 | 2.81cd |
| means | | 2.39 | | 3.24 |

ปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทุกปัญหาทดลองที่ระดับความแตกต่าง 5% โดยวิธี DMRT

ตารางผนวกที่ 7 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของจำนวนโคโลนีของ E. nigrifluens จากตัวอย่างดิน ที่คลุกด้วยชิ้นส่วนพืชที่เป็นโรค บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| reatment | 13 | 12643.375 | 972.5673 | 20.85** |
| ror | 42 | 1958.75 | 46.6369 | |
| otal | 55 | 14602.125 | | |

V%=13.9%

*=Significant at 1% level

**ตารางผนวกที่ 8** วิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดโคโลนี (มม.) ของ E. nigrifluens บนอาหารทดสอบ 14 ชนิด

| SV | DF | SS | MS | F |
|---|---|---|---|---|
| Treatment | 13 | 99.0375 | 7.618269 | 60.44** |
| Error | 42 | 5.29375 | 0.126042 | |
| Total | 55 | 104.331253 | | |

CV%=11.00%

**=Significant at 1% level