รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2559

1. ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาส้ม

2. โครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาส้มเปลือกล่อนในเขตภาคเหนือระยะที่ 2

กิจกรรม การปรับปรุงพันธุ์ส้มทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง

กิจกรรมย่อย -

3. ชื่อการทดลอง การทดลองที่ 1.1 การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางนริศรา	อินทจักร	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
ผู้ร่วมงาน	นายทวีพงษ์	ณ น่าน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
	นางสาวสุทธินี	ลิขิตตระกูลรุ่ง	สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
	ว่าที่ รต.ชัยกฤต	พรมมา	ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่
	นายวีระ	วรปิติรังสี	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย
	นายแสนชัย	คำหล้า	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ส้มเปลือกล่อนให้ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง โดยคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ จำนวน 119 สายต้น ในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ซึ่งได้ดำเนินการตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ.2558-2559 ทำการสกัดสกัดโปรตีนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase จากนั้นนำมาวิเคราะห์ peroxidase assay ซึ่งจะได้ค่าของ Peroxidase activity unit greening ของส้มลูกผสมต่างๆ เทียบกับของส้มแป้นและส้มสายน้ำผึ้งซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์ พบว่า ได้ต้นส้มลูกผสมที่มี Peroxidase activity มากกว่าส้มสายน้ำผึ้ง (ชุดควบคุมลบ) จำนวน 71 ต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 32 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 5 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 26 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 2 ต้น การทดลองนี้เป็นการคัดเลือกส้มลูกผสมเบื้องต้นที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งนำไปสู่การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง ซึ่งจะดำเนินการในปี 2559 – 2563 โดยปลูกต้นกล้าส้มลูกผสมคู่ต่างๆ ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ Peroxidase activity ลงในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน

6. คำนำ

พื้นที่ปลูกส้มเขียวหวานในเขตภาคเหนือของประเทศไทยได้ลดลงอย่างมาก โดยที่จังหวัดเชียงใหม่ลดลงจาก 93,047ไร่ ในปี 2551 เหลือเพียง 34,839ไร่ ในปี 2554 จังหวัดแพร่ลดจาก 40,000ไร่ เหลือไม่เกิน 10,000 ไร่ ในปี 2541 จังหวัดน่านลดลงจาก 20,000ไร่ เหลือ 1,900 ไร่ในปัจจุบัน สำหรับจังหวัดอื่นๆ ก็มีแนวโน้มลดลงอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน สาเหตุสำคัญมีหลายประการ เช่นต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ราคาส้มตกต่ำ ทำให้ผู้บริโภคหันไปนิยมส้มนำเข้าจากประเทศจีน แต่ปัจจัยสำคัญที่สุดก็คือ เกิดการระบาดของโรคกรีนนิ่ง ทำให้ต้นส้มทรุดโทรม ผลผลิตลดลงจนถึงไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย ผลส้มร่วงก่อนการเก็บเกี่ยว จากการสำรวจการระบาดของโรคกรีนนิ่งในเขตอำเภอฝาง แม่อาย และไชยปราการ โดยสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ในปี 2555 พบว่าจากพื้นที่สำรวจ 29,600ไร่ เกษตรกร 986 ราย มีถึง 91 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ทั้งหมดมีต้นส้มเป็นโรคกรีนนิ่งในระดับรุนแรง อย่างไรก็ตามในบางจังหวัด เช่น แพร่ น่าน และเชียงใหม่ กลับพบว่าเกษตรกรที่เคยปลูกส้มได้มีความสนใจที่จะกลับมาปลูกใหม่อีกครั้ง จากยอดจองกล้าพันธุ์จาก ศวพ.แพร่และศวพ.น่าน เนื่องจากส้มมีราคาดีขึ้นมากในปัจจุบัน

โรคกรีนนิ่ง(Greening disease) เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้แก่ส้มที่ปลูกในประเทศไทยมากที่สุดโรคหนึ่ง ส้มที่เป็นโรคจะให้ผลผลิตน้อยลง และไม่มีคุณภาพ โรคกรีนนิ่งจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลให้พื้นที่เพาะปลูกส้มลดลงอย่างมากและรวดเร็ว จากพื้นที่ปลูก 232,014 ไร่ในปี 2552 เหลือเพียง 147,673 ไร่ ในปี 2553 และผลผลิตลดลงจาก 514,678 ตัน เป็น 280,190 ตัน และพื้นที่ปลูกยังคงลดลงอย่างต่อเนื่อง ในปี 2553 พื้นที่ปลูกส้มลดลงเหลือ 102,726 ไร่ ผลผลิตลดลงเหลือเพียง 185,084 ตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) โรคกรีนนิ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ(*Candidatusliberibacter*asiaticus)ที่อาศัยอยู่ในท่ออาหารของต้นส้ม โดยมีเพลี้ยไก่แจ้ส้ม *Diaphorinacitri*Kuw. (Martinez and Wallace, 1967) และ *Triozaerytreae* (McClean and Oberholzer, 1965) เป็นแมลงพาหะนำเชื้อเข้าสู่ต้นส้มที่ปลูกแถบเอเชียและแอฟริกา ตามลำดับ ต้นส้มที่เป็นโรคจะมีอาการใบเหลือง ต้นโทรมเนื่องจากเชื้อโรคกรีนนิ่งเข้าไปอุดตันท่ออาหาร ทำให้การลำเลียงอาหารไปเลี้ยงรากผล และใบอ่อนได้ไม่เพียงพอ ใบแสดงอาการขาดธาตุอาหาร อาการแรกเริ่มคือใบมีจุดประสีเหลือง เส้นใบยังคงมีสีเขียว ถ้าอาการรุนแรงใบอ่อนจะมีสีเขียวซีด เส้นใบมีสีเหลือง และบวม (Nakashima *et.al.*, 1998) การที่ส้มเป็นโรคกรีนนิ่งทำให้ใบสังเคราะห์แสงได้น้อยลง การลำเลียงอาหารไปยังส่วนต่างๆ ติดขัดเนื่องจากท่ออาหาร (Phloem) อุดตันจากการขยายตัวอย่างรวดเร็วของเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่ง เป็นเหตุให้อาหารที่ไปเลี้ยงผลไม่เพียงพอ ผลจึงร่วงในที่สุด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุทำให้เชื้อโรคต่างๆ เข้าทำลายได้ง่ายและรุนแรงขึ้น เช่นโรครากเน่าโคนเน่า ทำให้ต้นส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง มีอาการโรครากเน่าโคนเน่ารุนแรงกว่าต้นที่ไม่ติดโรค ดังนั้นนักวิชาการจากทั่วโลกตลอดจนถึงตัวเกษตรกรเองต่างก็พยายามหาวิธีการป้องกันกำจัดโรคนี้ แต่ยังไม่สามารถแก้ไขได้ผลเป็น

ที่น่าพอใจ จึงเป็นโอกาสให้บรรดานักฉวยโอกาสหาวิธีการสร้างความร่ำรวยบนความเดือนร้อนของเกษตรกร เช่น การหลอกขายปุ๋ยน้ำหมักชีวภาพ ฮอร์โมนป้องกันผลร่วง ฯลฯ เมื่อเกษตรกรหลงเชื่อซื้อผลิตภัณฑ์ส่วนมากมีราคาแพงเกินเหตุ มาใช้ ระยะแรกต้นส้มอาจจะมีอาการดีขึ้นบ้าง หากแต่หลังจากนั้นอาการเดิมๆ จากโรคกรีนนิ่งก็จะกลับมาปรากฏให้เห็นอีก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ผู้เกี่ยวข้องกับวงการส้มจะได้ช่วยกันหาวิธีป้องกันกำจัดโรคนี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นการบรรเทาความเดือดร้อนของเกษตรกร แม้ว่าจะไม่สามารถแก้ไขได้อย่างเบ็ดเสร็จ แต่หากสามารถยืดอายุการให้ผลผลิตออกไปได้ หรือชะลอการติดโรคกรีนนิ่งให้ช้าลงบ้างหรือสามารถประคับประคองให้ส้มทนทานโรคอยู่ได้นานขึ้น ก็น่าจะช่วยให้เกษตรกรสามารถมีชีวิตที่ดีขึ้นได้ อย่างน้อยก็เป็นการสื่อถึงเกษตรกรได้ว่า รัฐไม่ได้ทอดทิ้งให้เกษตรกรดิ้นรนต่อสู้เพียงลำพังแต่อย่างใด

7. วิธีดำเนินการ

<u>การทดลองที่ 1.1</u>การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ(ปี 2558-2559)

ดำเนินการทดลองโดยใช้ต้นกล้าลูกผสมคู่ต่าง ๆ ที่มีต้นพ่อหรือแม่ หรือทั้งต้นพ่อและแม่มีประวัติทนทาน/ต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง ซึ่งเป็นลูกผสมชุดที่ 2 (แผนผังการปรับปรุงพันธุ์ส้มให้ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง) ทำการสกัดโปรตีนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase จากใบที่ 3 – 5 นับจากยอดของต้นกล้าลูกผสมทุกต้น และจากใบของส้มแป้นซึ่งต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งในระดับสูง (Resistance) รวมถึงจากใบของส้มสายน้ำผึ้งซึ่งอ่อนแอต่อโรคกรีนนิ่ง (Susceptible) การสกัดโปรตีนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ใช้กรรมวิธีของ Lowry *et al*. (1951) และดัดแปลงโดย Legget-Bailey (1962) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ peroxidase assay โดยวิธีของ Van Lelyveid *et al*. (1975) ซึ่งจะได้ค่าของ Peroxidase activity unit greening ของส้มลูกผสมต่างๆ เทียบกับของส้มแป้นและส้มสายน้ำผึ้ง (ชุดควบคุม)

สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน
2. ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร

อุปกรณ์

1. เครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ

2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (สเปกโตรโฟโตมิเตอร์)

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

1.1 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2.1 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

2.2 สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2

2.3 สีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250

2. สารเคมีที่ใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

1. สารละลายสับสเตรต

วิธีการ

1. การสกัดโปรตีน

การสกัดโปรตีนและเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากใบส้ม ดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) โดยชั่งใบส้มที่บดละเอียดจำนวน 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดที่แช่เย็นจัดแล้วเติมสารละลายสำหรับสกัด (extraction solution) คือ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นบดใบส้มให้ผสมเข้ากับสารละลายที่ใช้สกัดในโกร่งบดที่แช่ในอ่างน้ำแข็งจนเข้ากันดีประมาณ 1 นาที ปรับปริมาตรของสารละลายให้ครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายสำหรับสกัดแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 3,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังการปั่นนำเฉพาะของเหลวส่วนใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (crude enzyme) ไปใช้ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Dye binding ใช้วิธีของ Bradford (1976) วิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.1 การสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 50,100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงในหลอดทดลอง โดยให้ปริมาตรรวมในแต่ละหลอดเท่ากับ 300 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปหลอดละ 3 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.2 การวัดปริมาณโปรตีน

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จำนวน 200 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.2 ที่มีสารละลายโซเดียม-คลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงไป 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ลงไปหลอดละ 3.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน

2.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในตัวอย่างใบส้มในระหว่างเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็ง ใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Flurkey and Jen (1978) และวิธีของ Lee and Smith (1979) นำใบส้มไปสกัดเอนไซม์ และ วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาจำนวน 0.10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายสับสเตรต คือ สารละลายโซเดียมแอซีเทตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 ที่มีกัวอะคอลความเข้มข้น 0.5% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1% จำนวน 2.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรทันทีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำค่าที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างระยะเวลากับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวอย่างในช่วงของเส้นกราฟที่มีความชันเป็นเส้นตรง โดยกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.001 หน่วย ในเวลา 1 นาที ที่ค่าพีเอช 6.0 แล้วคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมของโปรตีนต่อนาที ตามสูตร ดังนี้

คำนวณหา Specific activity ของเอนไซมเพอรออกซิเดส ดังนี้

$$\text{Specific activity ของเอนไซม} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซมเพอรออกซิเดส}}{\text{ปริมาณของโปรตีนในหนวยมิลลิกรัม}}$$

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการส่งตัวอย่างใบของต้นส้มลูกผสมที่ได้ผสมตั้งแต่ปี 2556/2557 เพื่อวิเคราะห์ Peroxidase activity ในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จำนวน 119 สายต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 43 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 9 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวา) x แป้น จำนวน 37 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 23 ต้น ผลการวิเคราะห์ พบว่า สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มี Peroxidase activity มากกว่าชุดควบคุมลบ คือ ส้มสายน้ำผึ้งซึ่งมีปริมาณ Peroxidase activity $17.03x10^{3}$Unit/mg protein ได้จำนวน 71 ต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 33 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 5 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 23 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 3 ต้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบส้มลูกผสมจำนวน 119 สายต้น

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
Crt+	ส้มแป้น	42.31
Crt-	ส้มสายน้ำผึ้ง	17.03
1	ExP#1	31.62
2	ExP#2	55.74
3	ExP#3	55.92
4	ExP#4	60.48
5	ExP#5	55.7
6	ExP#6	38.66
7	ExP#7	37.15
8	ExP#8	57.08
9	ExP#9	3.67
10	ExP#10	14.29
11	ExP#11	30.78
12	ExP#12	54.32
13	ExP#13	45.78
14	ExP#14	10.81
15	ExP#15	72.05
16	ExP#16	12.69
17	ExP#17	14.62
18	ExP#18	32.15
19	ExP#19	54.52
20	ExP#20	49.78
21	ExP#21	36.81
22	ExP#22	71.4
23	ExP#23	52.52

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)
24	ExP#24	33.47
25	ExP#25	9.73
26	ExP#26	61.97
27	ExP#27	10.53
28	ExP#28	91.06
29	ExP#29	12.85
30	ExP#30	39.11
31	ExP#31	63.27
32	ExP#32	57.87
33	ExP#33	65.21
34	ExP#34	47.04
35	ExP#35	81.18
36	ExP#36	68.85
37	ExP#37	72.21
38	ExP#38	17.69
39	ExP#39	63.77
40	ExP#40	76.25
41	ExP#41	65.88
42	ExP#42	14.18
43	ExP#43	12
44	ExSP#1	17.29
45	ExSP#2	24.75
46	ExSP#3	13.19
47	ExSP#4	18.42
48	ExSP#5	26.82
49	ExSP#6	22.52
50	ExSP#7	14.88
51	ExSP#8	12.81
52	ExSP#9	14.07
53	GWxKW#1	17.86
54	GWxKW#2	26.21

55	GWxKW#3	21.35
56	SPxGW	21.26
57	GWxSP#1	24.97
58	GWxSP#2	18.12

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)

59	GWxSP#3	22.95
60	(PxKW)xP#1	25.22
61	(PxKW)xP#2	40.37
62	(PxKW)xP#3	26.73
63	(PxKW)xP#4	20.64
64	(PxKW)xP#5	29.6
65	(PxKW)xP#6	19.37
66	(PxKW)xP#7	22.49
67	(PxKW)xP#8	10.88
68	(PxKW)xP#9	19.44
69	(PxKW)xP#10	17.38
70	(PxKW)xP#11	26.58
71	(PxKW)xP#12	15.09
72	(PxKW)xP#13	19.02
73	(PxKW)xP#14	19.07
74	(PxKW)xP#15	63.93
75	(PxKW)xP#16	12.23
76	(PxKW)xP#17	18.24
77	(PxKW)xP#18	15.34
78	(PxKW)xP#19	18.65
79	(PxKW)xP#20	12.56
80	(PxKW)xP#21	8.25
81	(PxKW)xP#22	12.29
82	(PxKW)xP#23	9.91
83	(PxKW)xP#24	14.34
84	(PxKW)xP#25	12.58
85	(PxKW)xP#26	17.08
86	(PxKW)xP#27	31.55
87	(PxKW)xP#28	22.96
88	(PxKW)xP#29	5.3
89	(PxKW)xP#30	18.04
90	(PxKW)xP#31	23
91	(PxKW)xP#32	23.93

92	(PxKW)xP#33	13.65
93	(PxKW)xP#34	14.26

No	Line	Peroxidase activity (10^3xUnit/mg protein)

94	(PxKW)xP#35	30
95	(PxKW)xP#36	21.15
96	(PxKW)xP#37	8.22
97	PxO#1	14.79
98	PxO#2	19.04
99	PxO#3	48.29
100	PxO#4	9.53
101	PxO#5	64.84
102	PxO#6	13.07
103	PxO#7	10.98
104	PxO#8	10.73
105	PxO#9	15.62
106	PxO#10	11.04
107	PxO#11	10.83
108	PxO#12	7.05
109	PxO#13	10.18
110	PxO#14	16.76
111	PxO#15	10.83
112	PxO#16	8.85
113	PxO#17	8.64
114	PxO#18	10.09
115	PxO#19	10.39
116	PxO#20	9.12
117	PxO#21	11.26
118	PxO#22	10.38
119	PxO#23	16.23

หมายเหตุ

1. E x P หมายถึง เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น
2. E x SP หมายถึง เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มสายน้ำผึ้ง
3. GW x KW หมายถึง Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน
4. SP x GW หมายถึง ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash

5. GW x SP หมายถึง Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง

6. (PxKW)xP หมายถึง (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน) x ส้มแป้น

7. P x O หมายถึง ส้มแป้น x ส้ม Ocean

Peroxidase เป็น oxidase enzyme ที่พบทั่วไปในพืชชั้นสูง มีหน้าที่ทำลาย peroxide โดยการเคลื่อนย้าย peroxide ที่ได้จากการสะสมจากกระบวนการ metabolism ในเซล พบว่า peroxidase นี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานของพืชต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุ ซึ่งกิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อพืชถูกกระตุ้น หรือถูกทำลายโดยเชื้อสาเหตุ โดยที่กิจกรรมของเอ็นไซม์จะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ที่มีระดับความต้านทานต่างกัน การศึกษากิจกรรมหรือปริมาณ peroxidase ที่ไม่เพียงจะเกี่ยวข้องกับกลไกความต้านทานโรคแล้ว ยังเป็นแนวทางในการคาดคะเนความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุที่มีอยู่ในพืช (Reuveni *et al.*1992) จากผลการทดลอง พบว่า กิจกรรมของ peroxidase นั้น แตกต่างไปตามพันธุ์ส้ม โดยต้นส้มลูกผสมที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากกว่าชุดควบคุม นอกจากนี้กิจกรรม peroxidase จะสะสมหรือมีปริมาณมากบริเวณที่ถูกเชื้อเข้าทำลายและก่อให้เกิดผลการสร้างสาร suberin บริเวณผนังของเซล นับเป็นกระบวนการป้องกันตัวเองของพืชที่สร้างสิ่งขัดขวางหรือการกักเชื้อโรค (Melillo *et al.* 1992) ในพืชที่ต้านทานการเข้าทำลายของเชื้อจะกระตุ้นการเกิด O2 ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ทำให้เกิด Cell necrosis และปฏิกิริยาที่เป็น hypersensitivity (Zacheo and Bleve-Zacheo, 1988) เช่นเดียวกับการทดลองในปี 1988 ของ Van lelyveld, L.J และ Van vuuren, S.P. ที่พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ peroxidase ของส้มจะสูงในพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ มะนาวตาฮิติ การศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase สามารถตรวจสอบพันธุ์ส้มต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งหรือช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ส้มต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งเบื้องต้นได้ โดยใช้เป็น biochemical marker ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ทั้งนี้ควรตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR ร่วมด้วยเพื่อยืนยันผลการทดลองได้อย่างชัดเจน

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิเคราะห์ Peroxidase activity ในห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จำนวน 119 สายต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 43 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 9 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 37 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 23 ต้น สามารถคัดเลือกต้นส้มลูกผสมที่มี Peroxidase activity มากกว่าชุดควบคุมลบ คือ ส้มสายน้ำผึ้งซึ่งมีปริมาณ Peroxidase activity 17.03x10^3Unit/mg protein ได้จำนวน 71 ต้น ได้แก่ เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x ส้มแป้น จำนวน 32 ต้น, เขียวหวานน่าน (อีหลึก) x สายน้ำผึ้ง จำนวน 5 ต้น, Orange Greenwash x ส้มเขียวหวาน จำนวน 3 ต้น, ส้มสายน้ำผึ้ง x Orange Greenwash จำนวน 1 ต้น Orange Greenwash x ส้มสายน้ำผึ้ง จำนวน 3 ต้น, (ส้มแป้น x ส้มเขียวหวาน#4) x แป้น จำนวน 26 ต้น และ ส้มแป้น X ส้ม Ocean จำนวน 2 ต้น การทดลองนี้เป็นการคัดเลือกส้มลูกผสมเบื้องต้นที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่งในห้องปฏิบัติการ ซึ่งนำไปสู่การทดลอง

การคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง ซึ่งจะดำเนินการในปี 2559 – 2563 โดยปลูกต้นกล้าส้มลูกผสมคู่ต่างๆ ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้นโดยการวิเคราะห์ Peroxidase activity ลงในแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน ทำการคัดเลือกต้นที่ทนทานต่อโรคกรีนนิ่ง บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ข้อมูลอาการที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อโรคกรีนนิ่ง วิเคราะห์ตัวอย่างใบส้มที่สงสัยว่าจะติดเชื้อกรีนนิ่งทุก 3 เดือนร่วมกับ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืชเพื่อให้ได้ส้มลูกผสมที่มีลักษณะทนทานต่อโรคกรีนนิ่งอย่างแท้จริง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากการทดลองที่ได้สิ้นสุดในปี 2559 ซึ่งคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมเบื้องต้นโดยวิธีวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบ ในห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ทำให้สามารถคัดเลือกต้นส้มพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะต้านทานโรคกรีนนิ่งในการทดลองการคัดเลือกพันธุ์ส้มลูกผสมที่ต้านทาน/ทนทานต่อโรคกรีนนิ่งในแปลง ซึ่งจะดำเนินการในปี 2559 – 2563

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคณะผู้ร่วมงานจาก ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรน่าน และห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 ที่ได้ร่วมวิเคราะห์โปรตีนที่เกิดจาก Peroxidase activity ในใบส้มลูกผสมที่มีลักษณะต้านทานต่อโรคกรีนนิ่ง และได้ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. ข้อมูลผลิตสินค้าเกษตร. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http:// www. oae.go.th/ewt_news.php?nid=13577. (วันที่สืบค้นข้อมูล 2 กรกฎาคม 2556).

Martinez, A.L., and J.M. Wallace. 1967. Citrus leaf mottle-yellow disease in the Philippines and transmission of the causal virus by a psyllid, Diaphorina citri. Plant Disease. Reptr. 51:692-695.

McClean, A.P.D. and P.C.J. Oberholzer. 1965. Citrus psylla, a vector of the greening disease ofsweet orange. South Afr. J. Agric. Sci. 8:297-298.

Melillo M.T., T. Bleve-Zacheo and G. Zacheo. 1992. Role of peroxidase and esterase isozymes in pea roots infected with *Heterodera goettingiana*. Nematol medit. 20 :

171-179.

Nakashima K., Y. Ohtsu and M. Prommintara. 1998. Detection of greening organism in citrusplants and Psylla*Diaphorinacitri* in Thailand.Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64:153-159.

Reuveni. R., M. Shimori.; Z. Karchi, and J. Kuc. 1992. Peroxidase activity as biochemical marker for resistance of muskmelon (Cucumismelo) to Pseudoperonospora cubensis. Phytopath. 82 :749-753.

Van lelyveld, L.J และ Van vuuren, S.P. 1988. Peroxidase activity as a marker in greening disease of citrus for assessment of tolerance and susceptibility. Phytopathology J. 121:357-362.

Zacheo. G., and T. Bleve-Zacheo. 1998. Involvement of superoxide dismutases and Superoxide radicals in the susceptibility and resistance of tomato plants to *Meloidogyne incognita* attack. Physiological and Molecular Plant Pathology. 32 : 313.

14. ภาคผนวก

ภาพที่ 1 เตรียมตัวอย่างใบส้มเพื่อวิเคราะห์ Peroxidase activity