ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร

ประจำปี 2557

กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร
เลขที่ 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
www.doa.go.th/plan/

ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557



ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร

ประจำปี 2557

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ISBN 978-974-436-865-2

ปกหน้า-หลัง : ขนาด 21 x 29.7 ซม. (1 หน้า)



ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

กรมวิชาการเกษตร

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ISBN : 978-974-436-865-2



วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตรและเป็นศูนย์กลางรับรองตามมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

คำนำ

กรมวิชาการเกษตร เป็นหน่วยงานในสังกัดกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีบทบาทภารกิจด้านการวิจัยพัฒนาการเกษตรทางด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตร ตลอดระยะเวลาที่ผ่านมานักวิจัยของกรมวิชาการเกษตรได้ช่วยกันระดมสมองและความคิดในการสร้างสรรค์ผลงานวิจัยอันทรงคุณค่าเพื่อป้องกันและแก้ปัญหาการผลิตพืช รวมทั้งพัฒนาการเกษตรของประเทศไทยมาโดยตลอด จนเป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายว่าเป็นผลงานวิจัยที่มีประโยชน์ กลุ่มเป้าหมายสามารถนำไปใช้แก้ปัญหาในการผลิตพืชของเกษตรกรได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ก่อให้เกิดการพัฒนาการเกษตรด้านพืช ส่งผลให้การผลิตพืชของเกษตรกรไทยมีผลผลิตสูงขึ้น ต้นทุนการผลิตลดลง คุณภาพตรงตามมาตรฐานสามารถแข่งขันได้ในตลาดโลก ลดปัญหาการกีดกันทางการค้า สามารถส่งออกผลิตผลทางด้านพืชเพิ่มขึ้น สร้างรายได้ให้กับประเทศและเกษตรกรไทยในแต่ละปีมีมูลค่ามหาศาลอย่างต่อเนื่อง

ดังนั้นเพื่อเป็นเกียรติและสร้างขวัญกำลังใจแก่นักวิจัยที่ได้ทุ่มเท กำลังกาย กำลังใจและกำลังความคิด ในการศึกษาค้นคว้าวิจัย จนประสบผลสำเร็จได้ผลงานวิจัยที่มีคุณค่า กรมวิชาการเกษตรจึงได้จัดให้มีการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่นประจำปีขึ้นทุกปีอย่างต่อเนื่อง โดยจำแนกงานวิจัยที่จะพิจารณาเป็นผลงานงานวิจัยดีเด่น 6 ประเภท ได้แก่ งานวิจัยพื้นฐาน งานวิจัยประยุกต์ งานวิจัยปรับปรุงพันธุ์ งานพัฒนางานวิจัย งานวิจัยสิ่งประดิษฐ์คิดค้น และงานด้านบริการวิชาการ ซึ่งในปี 2558 หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร ได้คัดสรรผลงานวิจัย เพื่อส่งเข้ารับการพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557 รวม 35 เรื่อง มีผลงานวิจัย 11 เรื่อง ที่ผ่านการคัดเลือกจากคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร และได้รับการพิจารณาให้เป็นผลงานวิจัยระดับดีเด่น 2 เรื่อง ผลงานวิจัยระดับดี 5 เรื่อง และผลงานวิจัยระดับชมเชย 4 เรื่อง ตามรายละเอียดที่ปรากฏในหนังสือผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557 ฉบับนี้

ในนามคณะผู้บริหารกรมวิชาการเกษตรต้องขอขอบคุณนักวิจัย ผู้บริหาร ผู้เชี่ยวชาญและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้ ที่ได้ทุ่มเททั้งกำลังกาย กำลังใจและกำลังความคิดในการสร้างสรรค์ผลงานวิจัย และร่วมกันขับเคลื่อนผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตร สู่การใช้ประโยชน์ จนทำให้เกิดการพัฒนาการเกษตรของประเทศอย่างต่อเนื่อง และขอให้ท่านจงมีความภาคภูมิได้ว่า ท่านได้มีส่วนในพัฒนาการเกษตรของประเทศไทยให้มีความก้าวหน้าและทันสมัยอย่างต่อเนื่อง



(นายอนันต์ สุวรรณรัตน์)

อธิบดีกรมวิชาการเกษตร

พฤษภาคม 2558

สารบัญ

หน้า

ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน

ระดับดี

- พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* 1

ระดับชมเชย

- เครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา 17

ประเภทงานวิจัยประยุกต์

ระดับดีเด่น

- สารชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกแอซิด 45

ระดับดี

- วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 69

ระดับชมเชย

- การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ 90

ประเภทงานพัฒนางานวิจัย

ระดับดี

- การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงคุณภาพในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ 120

ระดับชมเชย

- เทคโนโลยีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชาเพื่อผลิตชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง 139

ประเภทงานวิจัยสิ่งประดิษฐ์คิดค้น

ระดับดี

- วิจัยและพัฒนาไถระเบิดดินดานสำหรับไร่มันสำปะหลังติดรถแทรกเตอร์ขนาดกลาง 153

สารบัญ

หน้า

ประเภทงานด้านบริการวิชาการ

<u>ระดับดีเด่น</u>

- หมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม “พันธุ์นครสวรรค์ 3” 167

<u>ระดับดี</u>

- ห้องปฏิบัติการเครือข่ายมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ในส่วนภูมิภาค เพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งและมั่นคงทางการเกษตรก้าวสู่ผู้นำ AEC 183

<u>ระดับชมเชย</u>

- มาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ 202

ภาคผนวก

- คำสั่งกรมวิชาการเกษตรที่ 1939/2557 เรื่องแต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร
- คำสั่งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ที่ 2/2557 เรื่องแต่งตั้งคณะอนุกรรมการพิจารณางานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

Development of New Isolate of *Bacillus subtilis* to Control *Alternaria brassicicola* , a Causal Agent of Chinese Kale Leaf Spot

บุษราคัม อุดมศักดิ์ [1/] ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/] สุรีย์พร บัวอาจ [1/]
บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ [1/] รสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง [1/]
Boossaracum Udomsak [1/] Nuttima Kositcharoenkul [1/] Sureeporn Bua-art [1/]
Buranee Puawongphat [1/] Rossukon Rungjang [1/]

ABSTRACT

Chinese kale leaf spot, causes by *Alternaria brassicicola*, has been one of important diseases of chinese kale causing damage at every growth stage in all production areas and brought about more fungicides use to control the disease. Biological control is an alternative consideration to reduce chemical usage. However, a limiting factor for biological control is the un-survival of antagonists on plant leaf surface. Promising antagonists may be the bacteria in Bacillus group which has a special ability in producing endospores that could tolerance and grew well in field condition. During October 2011 – September 2013, 135 isolates of *Bacillus* spp. isolated from soil, manure, and planting materials, were evaluated for the ability to inhibit growth of *A. brassicicola* using dual culture technique and 5 isolates found to highly inhibit mycelia growth of *A. brassicicola* were 20W1 20W5 20W4 20W12 and 17G18. These isolates were then tested for the disease control in the screen house by spraying of its cell suspension prior to the inoculation of the pathogen . We found that all isolates could effectively reduce chinese kale leaf spot disease to 46.77%, 52.81%, 59.99%, 60.45% and 71.31% respectively compared to 73.79% of the disease in non-antagonist spraying treatment. Field trial at Ta Maka District, Kanchanaburi province also showed the similar results. Those 5 isolates of *Bacillus* spp., then, were formulated into powder formulation and brought back to test at the same field. The results showed that all isolates could significantly control the disease better than a non-antagonist spraying treatment. *B. subtilis* 20W1 was the most effective one which could reduce the disease to 32.88%. Efficacy trial of the 20W1 isolate at 20-30 grams/20 liters of water showed the disease control at the same level as using mancozeb 80% WP at 40 grams/20 liters of water and significantly control the disease when applied at 40-50 grams/20 liters of water. In conclusion, *B. subtilis* 20W1 is a new isolate that showed high potential to develop to be bio-fungicide to use in farmers' field and upgrade to a commercial scale.

Key-words : *Alternaria brassicicola* , Chinese Kale Leaf Spot, Bacillus

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

โรคใบจุดคะน้า ซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* เป็นโรคที่มีความสำคัญ ทำความเสียหายกับคะน้าทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกแหล่งปลูก ทำให้มีการใช้สารเคมีในปริมาณสูง การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะลดการใช้สารเคมีได้ แต่ที่ผ่านมาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาควบคุมโรคพืชที่เกิดบนใบยังมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่สามารถเจริญบนพืชได้ ยกเว้นแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษในการสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนทานและสามารถเจริญได้ดีบนพืช จึงได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 ทำการคัดเลือกเบื้องต้นในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture technique จาก *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า ไอโซเลท 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มีศักยภาพสูงสุด นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบการควบคุมโรคเบื้องต้นในโรงเรือนโดยพ่น cell suspension ของ *Bacillus* spp. ก่อนปลูกเชื้อ *A. brassicicola* พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถลดการเกิดโรคได้ โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77 52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ โดยที่กรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. มีค่าเท่ากับ 73.79 นำทั้ง 5 ไอโซเลทไปทดสอบในแปลงปลูกที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยวิธีพ่นด้วย cell suspension พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นนำทั้ง 5 ไอโซเลทมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง นำไปทดสอบในแปลงปลูกเดิม พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลทมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% การทดสอบอัตราการใช้ของ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 พบว่า อัตรา 20 - 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นไอโซเลท 20W1 จึงเป็น *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพ ที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับแปลงเกษตรกร และสามารถนำไปขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไป

คำหลัก: คะน้า โรคใบจุด จุลินทรีย์ปฏิปักษ์

คำนำ

ปัญหาหลักของการปลูกคะน้าคือโรคและแมลงศัตรู โดยโรคพืชที่สำคัญคือ โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire เป็นเชื้อราที่มักทำให้เกิดโรคกับพืชผักตระกูลผักกาด เช่น คะน้า ผักกาดขาว และกะหล่ำปลี เป็นต้น อาการของโรคเกิดทุกส่วนของพืช ทั้งใบ ก้านใบ และลำต้น และพบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการในต้นแก่มักพบบนใบและก้านใบ เป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลือง ซึ่งจะขยายใหญ่ขึ้น และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สปอร์ของเชื้อราแพร่ไปตามลม น้ำ แมลง สัตว์ มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือ ระบาดมากในฤดูฝนหรือสภาพที่มีความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) โรคนี้พบได้ทุกแหล่งปลูก สามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงหรือด้อยคุณภาพ เกษตรกรจึงมักเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเป็นอันดับแรก และมักใช้อย่างผิดวิธีจึงทำให้เกิดผลกระทบของการใช้สารเคมีดังกล่าว การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในต่างประเทศมีการผลิตจำหน่ายในเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น *Bacillus subtilis* MBI 600 ; Integral ® หรือ *Bacillus subtilis* QST 713 ซึ่งได้รับการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา หรือ Environment Protection Agency ; EPA (WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm)

แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus สามารถพบได้ทั่วไปในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลายของซากพืชและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม-สามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอุลตร้าไวโอเลต และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *B. subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Baker and Cook, 1974) นอกจากนี้ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ยั้บยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Fiddaman and Rossal, 1994) ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชอย่างต่อเนื่อง จนสามารถพัฒนาเป็นชีวินทรีย์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช แบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชได้เช่นเดียวกับ Pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสง (นิพนธ์, 2538) พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลองที่ปลูกข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48 52.53 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 65.46% อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ณัฏฐิมา

และคณะ (2548) ได้แยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลท นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ 70-100% วรรณวิไล และคณะ (2548) ได้ทดลองพ่น *Bacillus* sp. ไอโซเลท WS 16 และWS 18 เพื่อควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูก พบว่า ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยน้ำนึ่ง ในปี พ.ศ. 2550 บุษราคัมและ ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอกและวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4 22W10 20W12 17G18 และ 20W4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* และ *F. solani* ได้ 100%

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานีสจะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ บุษราคัมและณัฏฐิมา (2553) ได้รายงานไว้ว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป *B. subtilis* คือสูตร FFS1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ โปรตีนปลา (เศษปลาหมักหรือปุ๋ยปลา) 10 มิลลิลิตร ผสมกากถั่วเหลือง 10 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด และการเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis*

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรัตน์ และ มณจันทร์ (2539) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช ในหนูถีบจักรเพื่อยืนยันความปลอดภัยนี้ ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียนี้ชนิดผง 2 ชนิด โดยผสมกับอาหารในอัตรา 1:10 โดยน้ำหนักซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำให้ใช้ทาแผลบนต้นพืช ทำการทดสอบให้อาหารกับหนูทางปากในอัตรา 10 กรัมต่อวันต่อตัว เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใด ๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยเฉพาะ *B. subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ที่มีความทนทาน สามารถพัฒนาและเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพแวดล้อม เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูกให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากที่ผ่านมาการนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมโรคพืชที่ระบบรากมักประสบความสำเร็จ แต่การนำมาใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดบนใบมักมีข้อจำกัด เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ไม่สามารถทนต่อสภาพอุณหภูมิสูง จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาพแปลงปลูก จึงต้องทำการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรค

สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ ตลอดจนขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเกษตรกรในการลดการใช้สารเคมีต่อไปในอนาคต

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dextrose agar) PSA (Potato sucrose agar) PSB (Potato sucrose broth) และผงทัลคัม
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 135 ไอโซเลท
3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ เครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) และตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ
4. วัสดุเกษตร เช่น ดินปลูก กระถางปลูก ปุ๋ยเคมี และสารกำจัดแมลง

วิธีการ: ประกอบด้วย 5 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 5 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

การทดลองที่ 1 ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากแหล่งเก็บจุลินทรีย์โรคพืช (culture collection) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร มาทดสอบศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. brassicicola* โดยวิธี dual culture technique (Morton and Stroube, 1955) ดังนี้

- เลี้ยงเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA และเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* spp. บนอาหาร PSA จนกระทั่งโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อที่เทอาหาร PDA ไว้แล้ว ใช้ Loop แตะเบา ๆ ที่โคโลนีของ *Bacillus* spp. ที่จะนำมาทดสอบ ซึ่งเลี้ยงไว้บนอาหาร PSA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาขีดเป็นเส้นตรงขนานกับโคโลนีของเชื้อราทดสอบ 4 ด้าน โดยมีระยะห่างประมาณ 2.5 เซนติเมตร โดยใช้ *Bacillus* spp.

1 ไอโซเลทต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีกรรมวิธีเปรียบเทียบ (control) ที่ใช้น้ำเปล่านึ่งฆ่าเชื้อแทนแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ทดสอบ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 25 ± 3 องศาเซลเซียส

การบันทึกข้อมูล : บันทึกผลโดยวัด inhibition zone ซึ่งเป็นบริเวณใสๆ ที่เชื้อรา *A. brassicicola* ไม่เจริญเติบโต โดยวัดระยะห่างจากแนวเส้น *Bacillus* spp. ถึงขอบเชื้อรา *A. brassicicola* ทั้งสี่ด้าน นำมาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของ inhibition zone โดยตรวจผลเมื่อกรรมวิธีเปรียบเทียบ เชื้อรา *A. brassicicola* เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

จากนั้นคัดเลือกไอโซเลท 5 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ไปทดสอบประสิทธิภาพในระดับโรงเรือนต่อไป

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือนทดลอง

นำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20W1 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

วิธีดำเนินการ:

ปลูกคะน้าในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว 5 ต้นต่อกระถาง จำนวน 20 กระถางต่อกรรมวิธี รวมทั้งสิ้น 140 กระถาง

นำ cell suspension ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ที่เลี้ยงโดยวิธีเดียวกับการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร พ่นลงบนคะน้าที่มีอายุประมาณ 60 วัน ให้ชุ่มทั้งใบและต้น ด้วยกระบอกฉีดน้ำแบบอัดลม เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วจึงพ่น cell suspension เชื้อรา *A. brassicicola* ความเข้มข้นประมาณ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ส่วนกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control -) พ่นด้วย และกรรมวิธีเปรียบเทียบ (Control +) พ่นด้วย *A. brassicicola*

การบันทึกข้อมูล : บันทึกความรุนแรงของโรคโดยประเมินพื้นที่ใบและต้นคะน้าที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มนับจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 21 วันหลังการทดสอบ

การทดลองที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง : วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มี 8 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* (Control +)

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมพืชและแปลงทดลอง : เตรียมแปลงขนาดกว้าง 1.2 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร หว่านเมล็ดคะน้า และถอนแยกให้มีระยะห่างระหว่างต้นประมาณ 10 เซนติเมตรและระยะห่างระหว่างแถวประมาณ 25 เซนติเมตร เมื่อคะน้ามีอายุ 35 วัน จึงเริ่มดำเนินการทดลอง

การเตรียมแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบ: เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 5ไอโซเลท บนอาหาร PSA เป็นเวลา 2 วัน นำมาทำเป็น cell suspensionโดยเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ขูดเอาเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารออก จากนั้นนำไปกวนให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสาร(magnetic stirrer) ปรับความเข้มข้นโดยเติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อลงไป เพื่อให้ได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มิลลิลิตรสำหรับเชื้อรา *A. brassicicola* เตรียมโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาทำเป็น cell suspension โดยใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับ *Bacillus* spp. ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มิลลิลิตร

การทดสอบ: พ่น cell suspension ของเชื้อ *Bacillus* spp.ที่เตรียมไว้ลงบนต้นคะน้า โดยใช้เครื่องพ่นชนิดอัดลม พ่นเชื้อ *Bacillus* spp. 2 ครั้งๆ ที่ 1 ก่อนพ่นเชื้อ *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน และครั้งที่ 2 หลังจากพ่น *A. brassicicola* เป็นเวลา 2 วัน

การบันทึกข้อมูล : บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 3 5 และ 7 วัน หลังการทดสอบ

การทดลองที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง : วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W4 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 17G18 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W12 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย *A. brassicicola* (Control +)

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง

- เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในอาหาร PSB บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมงแล้ว เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงไป เติมผงทัลคัม (Talcum) ลงไป 4 เท่าของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เตรียมได้ คนให้เข้ากัน นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์) นำมาบดให้ละเอียด เก็บในขวดแก้วและถุงพลาสติก ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปใช้ทดสอบ ต่อไป (Figure2)

การทดสอบ :

การเตรียมพืชและแปลงทดลอง ปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ดำเนินการทดลองที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี โดยนำชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ละลายน้ำ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นลงบนต้นคะน้าที่เตรียมไว้ 2 ครั้งโดยพ่นชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. ก่อน การพ่นเชื้อรา *A. brassicicola* 2 วัน และหลังการพ่น *A. brassicicola* 2 วัน พ่นด้วยถังพ่นชนิดอัดลม

การบันทึกข้อมูล :บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 3 5 และ 7 วันหลังการทดสอบ

การทดลองที่ 5 ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

การวางแผนการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 20 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง อัตรา 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 สารป้องกันกำจัดโรคพืช mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 Control (+) พ่น เชื้อรา *A. brassicicola*

กรรมวิธีที่ 8 Control (-) พ่นน้ำเปล่า

วิธีดำเนินการ:

การเตรียมพืชและแปลงทดสอบ:

- เตรียมแปลงปลูกคะน้า ที่ อ. ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี จำนวน 16 แปลง โดยมีขนาดแปลง เท่ากับ 1.50 x 30 เมตร ปลูกคะน้าโดยวิธีหยอดเมล็ด เมื่อคะน้าอายุได้ 60 วัน ทำการพ่นสารละลายชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 อัตราต่างๆ ตามกรรมวิธี โดยใช้วิธีปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4

การบันทึกข้อมูล: บันทึกความรุนแรงของโรค โดยประเมินพื้นที่ใบและต้นที่ถูกทำลายเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบและต้นทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซนต์โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ตรวจเช็คที่ 7 วันหลังการทดสอบ

การจัดจำแนกสปีชี่ส์ Bacillus : จัดจำแนกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API ® strip range technique (แหล่งที่มา: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891240/document)

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร อ. ท่ามะกา และ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบศักยภาพของ *Bacillus* spp. จำนวน 135 ไอโซเลท พบว่า มีแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 90 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. brassicicola* บนอาหาร PDA โดยมี 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *A. brassicicola* ได้แก่ 20W4 20W1 20W5 20W12 และ 17G18 โดยมีค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.68 1.60 1.58 1.46 และ 1.36 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *A. brassicicola* ได้สูงสุด (Table1)

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในโรงเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp.ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในโรงเรือนทดลอง พบว่า *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีเปรียบเทียบที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. (C+) โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรค รองลงมา ได้แก่ 20W5 20W4 20W12 และ 17G18 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 46.77 52.81 59.99 60.45 และ 71.31 ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 73.79 (Table 2)

3. ทดสอบประสิทธิภาพของ cell suspension ของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า ในแปลงปลูก

หลังการทดสอบ 3 วัน พบว่า *Bacillus* spp.ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำสุดเท่ากับ 2.70 และเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.40 รองลงมาได้แก่ 20W4 และ 20W12 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.91 และ 6.44 ตามลำดับ โดยทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 13.36 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการทดสอบ 5 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท 20W1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 2.79 6.23 และ 1.90 ตามลำดับ โดยที่ไอโซเลท 20W4 20W1 และ 20W12 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 21.68 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังการทดสอบ 7 วัน พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W4 มีประสิทธิภาพสูงสุดเทียบเท่ากับกรรมวิธีที่พ่นด้วย mancozeb โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.23 และ 2.42 ตามลำดับ โดยทุกไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 23.50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3**)**

4. ทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. สูตรผง ในแปลงปลูก

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในสภาพแปลงปลูก พบว่า หลังการทดสอบ 7 วัน กรรมวิธีที่มีการพ่น *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการพ่น *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W1 20W5 17G18 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 41.26 43.55 43.88 และ 48.52 ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด โดยสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% (Table 4)

5. ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 สูตรผง ในแปลงปลูก

ผลการทดสอบ พบว่า การพ่นด้วยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 ทุกอัตราที่ทดสอบได้แก่ 20 30 40 50 และ 60 กรัม/น้ำ 20 ลิตร สามารถลดการเกิดโรคได้เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่พ่น *B. subtilis* โดย อัตรา 20-30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 5)

การจัดจำแนก *Bacillus* : ผลการการจัดจำแนก *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ด้วยวิธี API ® strip range technique พบว่า 20W5 20W12 20W4 และ 20W1 (Figure 1) เป็น *B. subtilis* สำหรับไอโซเลท 17G18 เป็น *B. licheniformis* ซึ่งเป็นสปีชีส์หนึ่งที่ได้รับการขึ้นทะเบียนในต่างประเทศ ให้จำหน่ายเพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช เช่นกัน (http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/21989.pdf)

จากผลการทดลอง จะเห็นว่า ในการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท โดยการพ่นด้วย cell suspension นั้น ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุด คือ 20W4 แต่เมื่อนำทั้ง 5 ไอโซเลท มาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สูตรผง พบว่า ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด เนื่องจากมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำสุดเท่ากับ 41.26 โดยที่ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W5 และ 20W4 มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเท่ากับ 43.55 และ 43.88 ตามลำดับ และไม่แตกต่างทางสถิติ กับ 20W1 ก็ตาม แต่ในการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่จะสามารถนำไปใช้ในแปลงปลูกซึ่งแต่ละพื้นที่ปลูกอาจจะมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของจุลินทรีย์นั้น จำเป็นจะต้องคัดเลือกสายพันธ์ที่มีศักยภาพสูงสุด เมื่อมีการนำไปผสมปรุงแต่งให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่เกษตรกรสามารถใช้ได้สะดวก ง่าย ไม่ยุ่งยากนั้น จุลินทรีย์ดังกล่าวจะต้องสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และเพิ่มปริมาณในสภาพธรรมชาติได้ดี จึงจะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงสุด ดังนั้นในงานทดลองการคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ของจุลินทรีย์แอนทาโกนิสต์จึงจำเป็นที่จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์จนถึงระดับที่ทำเป็นสารชีวภัณฑ์ได้ จึงจะประสบผลสำเร็จ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายงานที่จำเป็นต้องคัดเลือกจนได้ไอโซเลทหรือสายพันธุ์ที่ดีที่สุดเพียงหนึ่งเดียว ซึ่งก็เพียงพอต่อการนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ เช่น Yun *et al.* (2013) ได้ทำการคัดเลือก *B. subtilis* ที่มีศักยภาพสูงสุดจากแบคทีเรีย Bacillus จำนวน 60 ไอโซเลทที่แยกได้จากธรรมชาติ เพื่อนำมาควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum*

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบศักยภาพเบื้องต้นของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. 135 ไอโซเลท คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพสูงสุด เพื่อนำไปทดสอบการควบคุมโรคใบจุดในแปลงปลูกคะน้า พบว่า *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการนำมาผลิตเป็นชีวภัณฑ์สูตรผงเพื่อใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *A. brassicicola* ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น *B. subtilis* โดยอัตราการใช้ที่เหมาะสมคือ 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร พ่นเมื่อเริ่มพบการเกิดโรค

ดังนั้นไอโซเลท 20W1 จึงเป็น *B subtilis* สายพันธุ์ใหม่ซึ่งคัดได้จากเศษวัสดุเกษตรมีศักยภาพที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ชนิดใหม่ใช้ควบคุมโรคใบจุดคะน้าในระดับแปลงปลูก และมีแนวโน้มที่สามารถนำไปขยายผลสู่เชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

การนำไปใช้ประโยชน์

1. เจ้าหน้าที่ส่งเสริม และเกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า และพืชตระกูลกะหล่ำอื่นในแปลงปลูก
2. นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปเป็นต้นแบบในการพัฒนา หรือต่อยอดกับงานวิจัยในการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี เพื่อขยายผลสู่เชิงพาณิชย์
3. เป็นทางเลือกในการนำไปใช้ในการผลิตพืชผักอินทรีย์

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ดร. ศรีสุข พูลผลกุล เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆในการดำเนินการทดลองนี้

เอกสารอ้างอิง

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี ฐิติเกียรติพงษ์ , อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. *ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548.* สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. *ใน: เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช.* สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. หน้า 210-211.*ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ* .(บทคัดย่อ) ครั้งที่ 8, 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน อ. เมือง จ. พิษณุโลก.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005 . *ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว. วารสารวิชาการเกษตร ม.ค.- เม.ย. 2544, 19(1) : 4-12.

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด.หน้า 93-94. *ใน: คู่มือโรคผัก*. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และวราภรณ์ สุทธิสา. 2548. การควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 123-130. *ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. ครั้งที่ 40 ม.เกษตรศาสตร์

อมรรัตน์ ทัศนกิจและมณจันทร์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ B. subtilis AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนูถีบจักร. หน้า 99-104.*ใน : การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*. ครั้งที่ 34 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539 กรุงเทพฯ.

Baker, K.F. and R. J. Cook. 1974. Biological Control of Plant Pathogen. W.H.Freeman, San Francisco. 433 p.

Environment Protection Agency. แหล่งที่มา: WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm., 28 พฤศจิกายน 2557

Fiddaman, P. J. and S. Rossall. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, J. Appl. Bacteriol. 76 (4) : 395-405.

Helene, C.; B.Wagner; F.Patrick and O. Marc.2011. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases, Walloon Centre of Industrial Biolog , Gembloux Agro-Bio Tech, University of Liege , Belgium, Brazil. แหล่งที่มา: http://cdn.intechopen. com/pdfs-wm/21989.pdf, 7 เมษายน 2558

Morton, D.J. and Stroube, W.H. 1955. Antagonistic and stimulatory effects of soil microorganisms upon Sclerotium rolfsii. Phytopathology. 45:417-420.

Mugg, P; S.Seymour and S.Clark. A New Method for the Identification of Bacillus spp. And Related Species involved in Food Poisoning and Spoilage. แหล่งที่มา: https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891240/document, 20 มกราคม 2558

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.

Yun, C.; Fang Y. and G. Jian-hua. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus Subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediat Iing biofilm formation, J. Environmental microbiology. Mar 2013 ; 15(3): 848-864

Table 1 Five isolates of *Bacillus* spp. that could highly inhibited the mycelial growth of *Alternaria brassicicola*, a causal pathogen of chinese kale leaf spot, in laboratory.

***Bacillus* spp. isolates**	**Average of Inhibition zone (cm.)**
20W4	1.68
20W1	1.60
20W5	1.58
20W12	1.46
17G18	1.36
Control[1]	0.00

[1] compare to sterile water

Table 2 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 21 days after applied with cell suspension of 5 isolates of *Bacillus* sp., compared to *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), in screen house.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**
20W1	46.77
20W5	52.81
20W4	59.99
20W12	60.45
17G18	71.31
Control (-)	0.00
Control (+)	73.79

Table 3 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 3 5 and 7 days after applied with cell suspension of 5 isolates of *Bacillus* spp., compared to mancozeb fungicide, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province,Thailand.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**		
	3 DAI[1/]	**5 DAI**[1/]	**7 DAI**[1/]
20W4	2.91 a	2.79 a	1.23 a
20W12	6.44 ba	10.38 cb	12.86 c
20W1	2.70 a	6.23 ba	8.72 cb
17G18	10.82 cb	15.24 dc	14.02 c
20W5	12.70 cb	14.60 dc	13.93 c
mancozeb 80% WP	1.40 a	1.90 a	2.42 ba
Control (-)	0.00 a	0.12 a	0.14 a
Control (+)	13.36 c	21.68 d	23.50 d
CV (%)	68.33	50.73	40.60

[1/] Days after inoculation

Table 4 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 7 days after applied with wettable powder suspension of 5 isolates of *Bacillus* spp., compared to mancozeb fungicide, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province,Thailand.

***Bacillus* spp. isolates**	**Infected leaf area (%)**
20W1	41.26 c
20W5	43.55 c
17G18	43.88 c
20W4	48.52 c
20W12	61.70 d
mancozeb 80% WP	23.37 b
Control (-)	0.00 a
Control (+)	79.70 e
CV (%)	11.21

Table 5 Percentage of leaf area infected by *Alternaria brassicicola* , 7 days after applied with wettable powder suspension of *Bacillus subtilis* 20W1 , 20 30 40 50 and 60 grams/20 liters of water compared to mancozeb 80 % WP, *Alternaria brassicicola* inoculation (C+) and water (C-), at farmer's farm in Kanchanaburi province, Thailand.

***Bacillus subtilis* 20W1 wettable powder (grams/20 liters of water)**	**Infected leaf area (%)**
20	7.79 b
30	5.76 b
40	1.88 a
50	0.91 a
60	5.85 b
mancozeb 40 grams	7.29 b
Control (-)	0.40 a
Control (+)	24.00 c
CV (%)	36.92



Figure 1 The colonies of *Bacillus subtilis* 20W1, on Potato Sucrose Agar medium



Figure 2 The wettable powder of *Bacillus subtilis* 20W1

เครื่องหมายโมเลกุลในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

Molecular Markers for Analysis of Genetics Diversity and Detection of Oil Palm Hybrid Tenera

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ [1/] อรรัตน์ วงศ์ศรี [2/] นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ [1/]

HATHAIRAT URAIRONG [1/] ORNRAT WONGSRI [2/] NAIYANATE JAROENSANTI TANAKA [1/]

ABSTRACT

The genetic diversity studies and shell type analysis of oil palm are achieved by molecular marker. Thirteen SSR markers loci were selected to be able to distinct 10 oil palm populations, Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania and La Me. The results showed that male parent oil palm, La Me has the most genetical differentiation from other male and female parent populations, followed by Calabar, Nigeria, Tanzania and Ghana. Among male parent oil palms, AVROS has the most genetic similarity to female parent, Deli Dura followed by DAMI. In addition, the new SSR markers were reselected for investigating the genetic diversity of Deli Dura populations as well as the progenies derived from inter-specific hybridization between *Elaeis guineensis* and *E.oleifera*. The obtained data are efficient to differentiate all oil palm populations. Moreover, the primers mEgCIR3428, mEgCIR3519 and mEgCIR0874, were sufficient to be used as markers in identifying Surat Thani 1-8 oil palm varieties. For analysis of oil palm shell type, the MADS-box gene of 129 samples included 3 shell types, Dura, Pisifera and Tenera from 10 distinct oil palm populations were sequenced and performed multiple nucleotides alignment. The SNPs that can differentiate the oil palm shell type in each population were discovered as follow, SNP_{ENGC} (T/C) in Ekona Ghana Calabar and Nigeria, SNP_{TaYa} (A/T) in Tanzania Yangambi, SNP_{DA} (C/G) in DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) in La Me and AVROS, SNP_{Tan} (C/G) in Tanzania. The obtained data of SNPs loci were used to generate 4 sets of primers and probes for accurately and rapidly determining oil palm shell type with real-time PCR as well as primer for general PCR. These markers are very applicable for quality control of Tenera oil palm seedling production for reducing or eliminating Dura contamination, and distinguishing the female and male parent genotype efficiently.

Key-words : Molecular Markers, Genetics Diversity, Oil Palm Hybrid Tenera

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology Research and Development)

[2] ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี (Surat Thani Oil palm Research Center)

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ได้ทำการคัดเลือก SSR Markers 13 ตำแหน่ง ที่สามารถให้ความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่มพันธุ์คือ Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me พบว่ากลุ่มพันธุ์พ่อที่มีความแตกต่างจากกลุ่มพันธุ์แม่และพันธุ์พ่ออื่น ๆ มากที่สุดคือ La Me รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana กลุ่มพันธุ์ AVROS มีพันธุกรรมคล้ายพันธุ์แม่ Deli Dura มากที่สุด รองลงมาคือ DAMI นอกจากนั้นได้ศึกษาพันธุกรรมของประชากร Deli Dura และลูกผสมต่างสปีชีส์ของ *Elaeis guineensis* กับ *E.oleifera* โดยใช้ SSR Markers 32 ตำแหน่งเพิ่มเติม ข้อมูลที่ได้สามารถใช้จำแนกกลุ่มพันธุ์ทั้งหมดออกจากกันได้และพบว่าไพรเมอร์ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะใช้จำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 1-8 ได้ สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ทำการอ่านและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ทั้งชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราของ 10 กลุ่มพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น จำนวน 129 ตัวอย่าง พบสนิปส์ที่สามารถแยกชนิดของปาล์มน้ำมันได้ คือ SNP_{ENGC} (T/C) ใน Ekona Ghana Nigeria และ Calabar, SNP_{TaYa} (A/T) ใน Tanzania Yangambi, SNP_{DA} (C/G) ใน DAMI, SNP_{LaAv} (C/A) ใน La Me และ AVROS, SNP_{Tan} (C/G) ใน Tanzania จากข้อมูล SNP ที่พบ ได้พัฒนาไพรเมอร์และโพรบจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบชนิดของปาล์มน้ำมันได้แม่นยำและรวดเร็ว ด้วยเครื่อง Real-time PCR และพัฒนาไพรเมอร์ที่ใช้กับเครื่อง PCR ทั่วไป เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจควบคุมคุณภาพกล้าปาล์มน้ำมันและคัดเลือกต้นพ่อพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก : เครื่องหมายโมเลกุล ความหลากหลายทางพันธุกรรม ปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา

คำนำ

อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีอัตราการขยายตัวที่ค่อนข้างสูงโดยมีการเพิ่มปริมาณของพื้นที่การปลูกปาล์มน้ำมันจาก 69,625 ไร่ในปี 2520 เป็น 4.5 ล้านไร่ ให้ผลผลิต 12.37 ล้านตันในปี 2556 รัฐบาลมีเป้าหมายในการขยายพื้นที่การปลูกให้ได้ 10 ล้านไร่ ภายในปี 2572 เพื่อให้ได้ผลปาล์ม 25 ล้านตันหรือน้ำมันปาล์มดิบ 4.5 ล้านตัน ทั้งนี้ ปาล์มน้ำมันมีส่วนแบ่งทางการผลิตสูงสุดถึงร้อยละ 73 ของอุตสาหกรรมน้ำมันพืชของไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2556) จากการวิเคราะห์ผลผลิตปาล์มน้ำมันของไทยต่อไร่ ต่อปี พบว่าผลผลิตค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับผลผลิตของประเทศมาเลเซีย ดังนั้น การปรับปรุงพัฒนาสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันให้มีผลผลิตสูง ตลอดจนใช้ต้นกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันที่ดีได้มาตรฐาน สามารถที่จะระบุประสิทธิภาพของการผลิตน้ำมัน รวมถึงการจำแนกและตรวจสอบพันธุ์ของปาล์มน้ำมัน จึงเป็นเรื่องสำคัญระดับต้นในการเพิ่มผลผลิตปาล์มน้ำมันสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มตามลักษณะของผลได้เป็น 3 ชนิด คือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา ซึ่งเป็นผลมาจากยีนควบคุมความหนาของกะลา (*SHELL* gene) 1 คู่ ดังนี้คือ ดูรา (Dura) มียีน

ควบคุมลักษณะเด่น (homozygous dominance, $Sh^{+}Sh^{+}$) ลักษณะผลมีกะลาหนา 2 – 8 มิลลิเมตร ไม่มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกบาง 35–60% ของน้ำหนักผล นิยมปลูกเป็นต้นแม่พันธุ์ คือ Deli dura

พิสิเฟอรา (Pisifera) ยีนควบคุมลักษณะผลแบบนี้เป็นลักษณะด้อย (homozygous recessive, $Sh^{-}Sh^{-}$) ลักษณะผลไม่มีกะลา มีข้อเสีย คือ ช่อดอกตัวเมียมักเป็นหมัน (abortion) ซึ่งทำให้ผลฝ่อลีบ ทะลายเล็ก เนื่องจากผลไม่พัฒนา ผลผลิตทะลายต่ำมาก ไม่ใช้ปลูกเป็นการค้าแต่ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์

เทเนอรา (Tenera) เป็นพันธุ์ทาง (heterozygous, $Sh^{+}Sh^{-}$) เกิดจากการผสมข้ามระหว่างดูราและพิสิเฟอรา ลักษณะผลมีกะลาบาง ตั้งแต่ 0.5– 4 มิลลิเมตร มีวงเส้นประสีดำอยู่รอบกะลา มีชั้นเปลือกนอกมาก 60-90% ของน้ำหนักผล ปาล์มน้ำมันชนิดเทเนอรา เป็นปาล์มที่ใช้ปลูกเป็นการค้าในปัจจุบัน เนื่องจากให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันที่สูงกว่าชนิดอื่น (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

จากร่างแผนยุทธศาสตร์ปาล์มน้ำมันและน้ำมันปาล์ม จะมีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันปีละ 2.5 แสนไร่ ปลูกทดแทนสวนปาล์มน้ำมันเก่า 0.3 แสนไร่ และปลูกทดแทนยางพารา 1.0 แสนไร่ รวม 3.8 แสนไร่ คิดเป็นความต้องการต้นกล้า 9,500,000 ต้น/ปี (25 ต้น/ไร่) หรือคิดเป็นเมล็ดงอก 11,400,000 เมล็ด/ปี (30 เมล็ด/ไร่) จึงมีผลทำให้ ความต้องการต้นกล้าปาล์มพันธุ์ดีมีสูงและเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีผู้นำกล้าปาล์มน้ำมันที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเก็บจากโคนต้นไปขายให้เกษตรกร ซึ่งมีการปะปนของต้นปาล์มชนิดดูราและพิสิเฟอรา กว่าเกษตรกรจะทราบว่าพันธุ์ปาล์มที่ปลูกไม่ได้มาตรฐานให้ผลผลิตต่ำ ก็ต่อเมื่อปาล์มน้ำมันที่ปลูกเจริญเติบโตเกือบ 3 ปี กระทั่งติดผล ทำให้เกษตรกรได้ผลผลิตต่ำ (ผลผลิตทะลายสดลดลง 15-35 เปอร์เซ็นต์) นอกจากผลผลิตลดลงแล้ว เกษตรกรยังต้องเสียเวลาปลูกทดแทนใหม่ ในระยะที่ผ่านมายังไม่มีเทคนิคในการตรวจความตรงตามพันธุ์และไม่มีวิธีการคัดแยกต้นแม่ดูราออกจากประชากรลูกผสมเทเนอราในระยะกล้าต้องรอจนติดผล เพื่อให้เกษตรกรได้กล้าพันธุ์ดีปลูก กรมวิชาการเกษตรได้แก้ไขปัญหาข้างต้นโดยการออกประกาศกรมฯ จดทะเบียนผู้ผลิตและจำหน่ายต้นกล้าปาล์มน้ำมันเพื่อสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ ในกรณีเกิดปัญหาเกษตรกรซื้อต้นกล้าปาล์มไม่ได้มาตรฐานมาปลูก (ซึ่งต้องรอจนปาล์มน้ำมันติดผล) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และชนิดของปาล์มน้ำมันในระยะต้นกล้า จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อช่วยในการควบคุมคุณภาพของต้นกล้าปาล์มน้ำมันตาม พรบ.พันธุ์พืช พ.ศ. 2518 (ฉบับที่ 2 พ.ศ.2541) แต่เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นไม้ยืนต้นมีอายุยืน การปรับปรุงพันธุ์จึงทำได้ช้ามาก ในแต่ละรอบของการปรับปรุงพันธุ์ต้องใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 10 – 12 ปี การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้จึงสามารถลดระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์แล้ว ยังสามารถช่วยในการศึกษาและจำแนกความแตกต่างหรือความหลากหลายของประชากรที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ด้วย งานทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เครื่องหมายโมเลกุลศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกปาล์มน้ำมันชนิดดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอราในระยะต้นกล้า

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างเชื้อพันธุกรรมปาล์มน้ำมัน ที่รวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี 653 ตัวอย่างพันธุ์และพันธุ์ปาล์มน้ำมันของเอกชน 60 ตัวอย่างพันธุ์ รวม 713 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย

1.1 ประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ (Deli Dura) 246 ตัวอย่างพันธุ์

1.2 ประชากรที่ใช้เป็นต้นพ่อพันธุ์ (Pisifera) 151 ตัวอย่างพันธุ์ ประกอบด้วย AVROS, Calabar, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, DAMI และ Yangambi

1.3 ประชากรลูกผสมเทเนอรา (Tenera) พันธุ์สุราษฎร์ธานี 1 - 8 รวม 74 ตัวอย่างพันธุ์

1.4 ประชากรปาล์มน้ำมันต้นเตี้ย *Elaeis oleifera* และลูกผสมระหว่าง *E.guineensis x E.oleifera* จำนวน 182 ตัวอย่างพันธุ์

1.5 ประชากรปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน 60 ตัวอย่างพันธุ์

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่งบดพร้อมสาก, เครื่องปั่นเหวี่ยง, อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ฯลฯ

3. micro pipette ขนาดต่างๆ พร้อม Pipette tip

4. micro centrifuge tube ขนาด 1.5 และ 0.2 มิลลิลิตร

5. เครื่อง PCR (Gene Amp 9700)

6. เครื่อง StepOnePlus™ Real-Time PCR (Applied Biosystems®)

7. เครื่อง Spectrophotometer

8. เครื่อง gel documentation

9. เครื่องอ่านลำดับพันธุกรรม ABI for Genetic Analyzer 377 และ 310

10. สารเคมี/วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

10.1 SSR primer ที่ติดฉลากฟลูออเรสเซนต์

10.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เช่นไนโตรเจนเหลว, แอลกอฮอล์, คลอโรฟอร์ม, CTAB (Hexadecyl trimetylammonium bromide)

10.3 สารเคมีใช้ในขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ dNTPs, PCR buffer, Tag DNA polymerase ฯลฯ

10.4 สารเคมีที่ใช้ในการอ่านลำดับพันธุกรรมดีเอ็นเอ

10.5 ชุดสกัด Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific)

10.6 TaqMan® Genotyping Assay

10.7 TaqMan® MGB probes and primer

วิธีการ

I. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมัน มีขั้นตอน ดังนี้

1.1 สกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง โดยการสุ่มเลือกจากประชากรปาล์มน้ำมัน 10 กลุ่ม (กลุ่ม Deli Dura ที่ใช้เป็นพันธุ์แม่ 9 ตัวอย่าง นอกนั้นเป็นเชื้อพันธุ์ที่ใช้เป็นพ่อ 9 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัวอย่าง ได้แก่ AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me) การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการของ Agrawal *et al.* (1992) ซึ่งมีการดัดแปลงเล็กน้อยโดยหทัยรัตน์และคณะ (2548) ดังนี้ นำตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน 2 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยโกร่งให้ละเอียดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์สกัด (Extraction buffer) (2xCTAB; 2% (w/v) Cethyl trimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 50 mM Na_2 EDTA, 100 mM Tris-Hcl (PH8.0) และ 2 มิลลิลิตร 2-mercaptoethanol) ปริมาณ 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยเขย่าหลอดทุก 10 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 700 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลอดโดยวิธีกลับหลอดไปมา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตท 50 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง จึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (1 mM Na_2 EDTA 10 m M Tris-Hcl pH 8.0) จำนวน 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer

1.2 การทำปฏิกิริยา PCR หรือการขยายยีนในหลอดทดลอง นำ SSR primer (Billotte *et al.* 2005) 100 คู่ ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ที่ปลาย 5' นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้ดีเอ็นเอ ในข้อ 1.1 เข้มข้น 50 ng เป็นแม่พิมพ์ ซึ่งมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้คือ Tris – HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, gelatin 0.01%, dNTP 1.6 mm ใช้ไพรเมอร์ forward และ reverse เข้มข้น 0.25 mM , Tag DNA polymerase 0.5 unit ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ul ด้วยเครื่อง Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 95^{0}C 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94^{0}C 30 วินาที 55 ^{0}C 30 วินาที 72^{0}C 30 วินาที 35 รอบ และ 72^{0}C 7 นาที 1 รอบ

1.3 การวิเคราะห์ผลิตผล นำผลิตผล PCR ในข้อ 1.2 จำนวน 1 µl ไปแยกขนาดด้วยเครื่อง ABI prism 310 และ 377 วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genescan และ

Genotyper ตามเอกสารแนะนำการใช้คู่มือของบริษัทที่ผลิตเครื่องมือ (Anonymous, 1997) เลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิต PCR ชัดเจนและมี allele ที่แตกต่างกัน (polymorphic)

2. จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน

2.1 สกัดดีเอ็นเอ ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ปลูกรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี และพันธุ์ปาล์มของบริษัทเอกชน รวม 713 ตัวอย่างพันธุ์ โดยสกัดดีเอ็นเอตามวิธีข้อ 1.1

2.2 การขยายยีนในหลอดทดลองและการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1 เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 ng/ul ใช้เป็นแม่พิมพ์สำหรับการขยายยีนในหลอดทดลองใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลอง โดยมีองค์ประกอบและสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับข้อ 1.2 จากนั้นแยกขนาดของผลผลิต PCR ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 หรือ 377 Genetic for Analyzer วิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม Genotyper วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันโดยการวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม (Cluster Analysis) และสร้าง Dendrogram หรือ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม SPSS

II. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

การศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดสนิปส์ ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับเบสในจีโนมิคดีเอ็นเอ บริเวณเป้าหมายที่เกิดการกลายพันธุ์แบบแทนที่ (Substitution) เพียงหนึ่งตำแหน่ง โดยใช้พันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิด คือ พันธุ์แม่ชนิดดูรา พันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอราและพันธุ์ลูกผสมชนิดเทเนอราของ 10 กลุ่มพันธุกรรมคือ Deli Dura , DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi AVROS และ Calabar จำนวน 129 ตัวอย่างพันธุ์ ทำการสกัดดีเอ็นเอของใบปาล์ม ตามวิธี ในข้อ 1.1 ซึ่งดัดแปลงจาก Agrawal *et al*. (1992)

2.1 การทำปฏิกิริยา PCR ขยายยีน MADS-box ของปาล์มน้ำมัน

จากการรายงานของ Singh *et al.* (2013) พบว่ายีนที่ควบคุมกะลาของปาล์มน้ำมันมีความคล้ายคลึงกัน (homologous) กับยีน seedstick ที่จัดอยู่ในกลุ่มยีน MADS-box จึงได้ใช้ไพรเมอร์ในบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ (Conserved region) ซึ่งจะจับกับดีเอ็นเอบริเวณนี้ของปาล์มน้ำมันทุกพันธุ์ไปขยายยีน (amplified) บริเวณ MADS-box ของปาล์มน้ำมันทั้ง 129 ตัวอย่างที่สกัดดีเอ็นเอไว้แล้ว โดยใช้ปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด 20 ul ประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 50 ng/ul จำนวน 2 ul , 10x PCR buffer 2 ul , 4 mM dNTPs 2 ul , 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ul , 5 Unit/ul *Tag* DNA polymerase , (Bioline ,USA) 0.2 ul , 5 mM ของคู่ไพรเมอร์ อย่างละ 0.5 ul ปรับน้ำกลั่นให้ได้ 20 ul และตั้งสภาวะการทำงานของเครื่อง PCR ดังนี้ 95 ˚C 7 นาที 1 รอบ 94 ˚C 30 วินาที 55 ˚C 30 วินาที และ 72 ˚C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 ˚C เป็นเวลา 7 นาที อีกรอบ 1 รอบ นำผลผลิตของ PCR ที่ได้แยก

ด้วยอิเล็กโตรโพรีซีส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting temperature agarose ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Star® (Cambrex Bio science, USA) นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง Gel Documentation ตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแยกดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก agarose โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN , Germany)

2.2 การอ่านลำดับดีเอ็นเอ (DNA Sequencing) ของยีน MADS-box

ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ในข้อ 2.1 นำไปทำการอ่านลำดับพันธุกรรมหรือลำดับเบส 2 ครั้งต่อแถบดีเอ็นเอ โดยอ่านลำดับเบสในทิศทาง forward primer และ reverse primer เพื่อยืนยันผลและได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง โดยใช้เครื่อง ABI for Genetic Analyzer 377 และ 310

2.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างดีเอ็นเอมากกว่า 2 เส้น (Multiple Sequence Alignment)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MADS-box ที่อ่านได้ในข้อ 2.2 มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (เบส) โดยใช้โปรแกรม Clustal W2 โดยเปรียบเทียบทีละกลุ่มพันธุ์ เมื่อพบตำแหน่งของเบสตั้งแต่หนึ่งตัวขึ้นไปมีการเปลี่ยนแปลง (mutation) ในแต่ละชนิดของปาล์มน้ำมัน ทำการตรวจสอบจุดนั้นๆ เพื่อยืนยันซ้ำ โดยดูจากกราฟของลำดับนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) อีกครั้งหนึ่ง เมื่อพบตำแหน่งสนิปส์ แล้วนำข้อมูลของสนิปส์และนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป มาออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

III. การตรวจสนิปส์เพื่อวิเคราะห์ชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วยเครื่อง Real Time PCR

3.1 การออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์

การออกแบบไพรเมอร์และโพรบ ใช้โปรแกรมของ TaqMan probe and primer chemistry and design ของ Applied Biosystems ซึ่งแต่ละตำแหน่งของสนิปส์จะออกแบบไพรเมอร์ 1 คู่ ขนาบข้างสนิปส์นั้นและออกแบบโพรบที่มีความยาว 13 คู่เบส 2 เส้น ที่เป็นคู่สมกันกับบริเวณรอบ ๆ สนิปส์ (ยกเว้นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสนิปส์) โพรบเส้นแรกติดฉลาก ด้วยฟลูออเรสเซนต์สี VIC ที่ปลาย 5’ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์เหมือนลำดับเบสของปาล์มน้ำมันต้นแม่ดูรา และปลาย 3’ ของโพรบติดฉลากด้วย Quencher และ Minor Groove Binder (MGB) สำหรับโพรบอีกเส้นหนึ่งจะคล้ายโพรบตัวแรก แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งสนิปส์ จะเหมือนกับลำดับเบสของต้นพ่อพิสิเฟอรา และติดฉลากที่ปลาย 5’ เป็นสี FAM ที่ต่างจากสีโพรบตัวแรก ทำการสั่งโพรบและไพรเมอร์จากบริษัท Applied Biosystems สหรัฐอเมริกา และตรวจด้วยเครื่อง Real time PCR หากนำดีเอ็นเอของพันธุ์แม่ดูรามาตรวจโพรบที่ตำแหน่งสนิปส์เหมือนต้นแม่ดูราเท่านั้นที่จะจับกับดีเอ็นเอของดูราได้ เมื่อมีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ สี VIC ทางปลาย 5’ จะถูกตัด (Hydrolysis) ออกห่างจาก Quencher ที่อยู่ปลาย 3’ของโพรบ ทำให้ปรากฏเส้นกราฟสีเหลืองของ VIC เพิ่มขึ้นตามจำนวนก็อปปี้ของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ และตามจำนวนรอบของ PCR ที่เพิ่มขึ้น ถ้าตรวจดีเอ็นเอของพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ต้องให้ผลเป็นกราฟ 2 เส้นทั้งของพันธุ์แม่และพ่อ

3.2 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

นำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันชนิดต่างๆ ทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB จากข้อ 2.1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใช้เป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจวิเคราะห์สนิปส์บนเครื่อง Real time PCR ด้วยไพรเมอร์ และ TaqMan® MGB probes ที่ออกแบบไว้ในข้อ 3.1 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ดังต่อไปนี้ 2x TaqMan® Genotyping master mix 5 ไมโครลิตร 20x Assay primer and probe 0.25 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอปาล์มน้ำมัน 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นสำหรับ PCR 3.7 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง StepOnePlus™ Real time PCR (Applied Biosystems®, USA) โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้ 95 ˚C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 ˚C 20 วินาที และ 60 ˚C 60 วินาที จำนวน 50 รอบ ค่าของสีฟลูออเรสเซนต์ จะถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำ PCR การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งสนิปส์ จะสร้าง Allelic Discrimination ของตัวอย่างด้วยโปรแกรม StepOne ™ V 2.3 ซึ่ง allele ของพันธุ์แม่ชนิดดูรา จะอยู่ที่แกน X และ Allele ของพันธุ์พ่อชนิดพิสิเฟอรา จะอยู่แกน Y ลูกผสมจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง พันธุ์ปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีที่นำมาตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้ ทราบกลุ่มพันธุ์และชนิดของปาล์มแล้วการตรวจสนิปส์ครั้งนี้จึงถือเป็นการตรวจสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบของสนิปส์ตำแหน่งต่างๆ ด้วย

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน

ได้ทำการเก็บตัวอย่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท อาร์แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา, บริษัท โกลเด้น เทเนอรา, บริษัท ยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และ บริษัท ทักษิณปาล์ม จำกัด ซึ่งปลูกที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง นำใบมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี CTAB ตามข้อ 1.1 ตรวจชนิดของปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธีเดียวกันข้อ 3.2 แต่เลือกใช้ไพรเมอร์และโพรบตามตำแหน่งสนิปส์ที่ตรวจสอบได้จากประวัติพันธุ์ของแต่ละบริษัท และทดลองใช้ไพรเมอร์และโพรบตำแหน่งอื่น ๆ ตรวจวิเคราะห์ด้วย

IV. การพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ใบปาล์มน้ำมันที่โตเต็มที่แล้วการบดให้ละเอียดนั้นค่อนข้างยาก ต้องเสียเวลาบดและใช้แรงงานในขั้นตอนนี้มาก จึงจะได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพดี เพื่อให้การตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น จึงได้นำชุดสกัดสำเร็จรูปมาใช้ร่วมกับเทคนิค Nested PCR ดังวิธีการต่อไปนี้

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ ตัดปลายใบปาล์มน้ำมันให้มีขนาดประมาณ 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติก เติมน้ำกลั่นผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 300 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ค้อนหรือด้ามกรรไกรขูดใบปาล์มจากภายนอกถุงจนได้น้ำสีเขียว ดูดน้ำสีเขียว 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่ใส่ Dilution buffer (Phire Plant Direct PCR Kit ; Thermo Scientific) ไว้ 18 ไมโครลิตร ผสม

ของเหลวให้เข้ากันแล้วนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ หรือ เก็บไว้ในหลอดเดิมโดยไม่ให้ขุ่น สำหรับใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ต่อไป

4.2 การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ใช้เทคนิค Nested PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ MADS – box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของยีนนี้คือ 5'-TTGCTTTTAATTTTGCTTGAATACC-3' และ 5'-TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC-3' โดยมีปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ 2 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ ในข้อ 4.1 จำนวน 1 ไมโครลิตร เติม Master Mix ในชุด Phire Plant Direct PCR Kit ให้ครบ 20 ไมโครลิตร นำไปเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง PCR Gene Amp 9700 โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้ 98 ˚C 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 98 ˚C 5 วินาที 58 ˚C 30 วินาที ที่ 72 ˚C 20 วินาที จำนวน 25 รอบ และ 72 ˚C 1 นาที 1 รอบ ทำปฏิกิริยา PCR เช่นนี้อีก แต่เพิ่มรอบการขยายยีนเป็น 30, 35 และ 40 รอบ ตามลำดับ

4.3 การตรวจวิเคราะห์สนิปส์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน ด้วย Real time PCR โดยนำผลผลิตจาก Nested PCR ข้อ 4.2 มาเจือจาง 500 เท่า (ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ผสมน้ำสำหรับทำ PCR 499 ไมโครลิตร) จากนั้นเตรียมปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับ ข้อ 3.1 โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางไว้ 1 ไมโครลิตร เป็นแม่พิมพ์ องค์ประกอบของปฏิกิริยาและการตั้งเครื่อง ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.2

V. การพัฒนาวิธีตรวจสนิปส์เพื่อแยกชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

ออกแบบไพรเมอร์ชนิด allele specific PCR primer สำหรับตรวจวิเคราะห์สนิปส์ 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA}, SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAv} โดยการออกแบบ forward primer ตัวสุดท้ายทางปลาย 3' เป็นตำแหน่งสนิปส์และเปลี่ยนอีก 2 ตำแหน่งถัดมา ให้จับกับพันธุ์ที่เป็นชนิดดูรา ออกแบบไพรเมอร์ 3 เส้นลักษณะเดียวกัน แต่ทำการเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ใหม่ของไพรเมอร์ 3 ตัวสุดท้ายทางปลาย 3' ให้จับกันกับตำแหน่งสนิปส์ของปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอราอีก 3 เส้น ทำเช่นนี้ทุกตำแหน่งรวมออกแบบและสังเคราะห์ forward primer 24 เส้น สำหรับ reverse primer ทำการออกแบบไว้คนละตำแหน่งโดยให้ผลผลิตของ PCR ของชนิดดูรา สั้นกว่าของชนิดพิสิเฟอรา เพื่อที่จะได้ตรวจสอบเทเนอราได้ง่ายขึ้น โดยใช้ agarose gel electrophoresis ทั่วไป

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

I. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน

1. การคัดเลือก SSR primer ในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายของพันธุ์ปาล์มน้ำมันจากการสุ่มเลือกปาล์มน้ำมัน 36 ตัวอย่าง จากประชากรที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ (Deli Dura) และประชากรที่เป็นพ่อพันธุ์ (Pisifera) มาใช้ในการคัดเลือกไพรเมอร์ ที่เหมาะสมในการใช้ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน พบว่ามีไพรเมอร์ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ในกลุ่มต่าง ๆ นี้มีจำนวนมาก จึงทำการคัดเลือก primer ที่ดีที่สุดไว้ 13 คู่ ได้แก่ mEgCIR0074, mEgCIR0173, mEgCIR0804, mEgCIR3428, mEgCIR3641, mEgCIR3643, mEgCIR3698, mEgCIR0874,

mEgCIR2215, mEgCIR2577, mEgCIR3519, mEgCIR3593 และ mEgCIR3755 เกณฑ์การคัดเลือกโดยดูจากจำนวน alleles หรือแถบดีเอ็นเอ ที่พบมากกว่าในการปฏิกิริยาขยายยีนในหลอดทดลอง (PCR) ซึ่งที่พบมีตั้งแต่ 2 ถึง 11 แถบ หรือ alleles

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ ที่คัดเลือกไว้ 13 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากรปาล์มน้ำมันที่เป็น พ่อและแม่พันธุ์ในการผลิตปาล์มน้ำมันลูกผสม 471 ต้น ของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 6,123 ข้อมูล ในจำนวนนี้มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ 246 ต้น ประชากรที่ใช้เป็นต้นพ่อ (Pisifera) กลุ่มต่าง ๆ 151 ต้น และกลุ่มประชากรเทเนอรา (Tenera) ที่ส่งเสริมให้ปลูกเป็นการค้า (สุราษฎร์ธานี 1 -8) 74 ต้น พบว่าในจำนวนไพรเมอร์ 13 คู่ที่ใช้ ให้ alleles หรือ แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 95 แถบ โดยที่แต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันหรือมีความผันแปรตั้งแต่ 5 – 11 แถบ หรืออาจกล่าวว่า โดยเฉลี่ยแต่ละไพรเมอร์ให้ alleles ที่ต่างกันถึง 7 แบบ โดยที่ไพรเมอร์ mEgCIR0874 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมากสุดถึง 11 แบบ ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 215, 217, 221, 231, 235, 237, 239, 247, 249, 255 และ 257 คู่เบส รองลงมาคือไพรเมอร์ mEgCIR0804 และ mEgCIR2215 ที่ให้แถบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันถึง 10 และ 9 แถบ ตามลำดับ ขณะที่ไพรเมอร์ mEgCIR3698 ให้ alleles หรือแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันน้อยสุดเพียง 5 แถบ คือ ขนาด 164, 166, 172, 174 และ 182 คู่เบส เป็นที่น่าสังเกตว่าไพรเมอร์ เกือบทั้งหมดให้ขนาดของ alleles ที่ต่างกันเพียง 2 คู่เบสเท่านั้น เช่นไพรเมอร์ mEgCIR0074 ให้ alleles ที่ต่างกัน 7 แบบ ที่มีขนาดความยาวตั้งแต่ 118, 120, 122, 124, 126, 128 และ 130 คู่เบส การที่ alleles ส่วนใหญ่มีความยาวต่างกันเพียง 2 คู่เบส ทำให้ผู้ที่จะนำไพรเมอร์นี้ไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน ต้องระมัดระวังในการอ่านค่า มิเช่นนั้นจะผิดพลาดได้ง่าย สำหรับขนาดและจำนวน alleles ที่พบในการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอครั้งนี้แสดงไว้ใน Table 1 และ 2 ซึ่งจะพบว่าแต่ละตำแหน่งของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ให้ผลผลิต PCR ที่มี heterozygosity ต่ำ หรือหมายความว่าตำแหน่งเหล่านี้ขนาดของ alleles พ่อกับแม่เท่ากัน (homozygous) เป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0173 และ mEgCIR0804 สำหรับ Table 3 ได้สรุปขนาดของ alleles ที่ได้จากไพร์เมอร์ 13 คู่เป็นประชากรแม่พันธุ์ (Deli Dura) และประชากรพ่อพันธุ์ 10 กลุ่ม ข้อมูล alleles นี้ สามารถคะเน alleles ของลูกผสมชนิด Tenera ได้จึงมีประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมเทเนอรา ตัวอย่างเช่น เมื่อดูแถวแรก primer mEgCIR0074 จะพบว่า ประชากรที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์เฉพาะกลุ่ม Tanzania มีแถบดีเอ็นเอที่พบในปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้เพียง 1 แถบคือ ขนาด 122 คู่เบส ขณะที่แม่พันธุ์ Deli Dura ใน primer เดียวกันให้แถบดีเอ็นเอเดียวเช่นกัน คือ ขนาด 120 คู่เบส ดังนั้นลูกผสม Tenera ที่ได้จากคู่ผสมนี้จะมีแถบดีเอ็นเอ 120 และ 122 คู่เบส ซึ่งอาจใช้เป็นแถบเอกลักษณ์ของคู่ผสมนี้ได้ด้วย และจาก Table 3 เมื่อดูความแตกต่างภายในประชากรแต่ละกลุ่ม จะพบว่า primer ทั้ง 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura ได้เลย ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0804 ที่มี alleles ต่างกัน 195 และ 201 คู่เบส สำหรับประชากรพ่อพันธุ์กลุ่มอื่นที่มีความ

ผันแปรน้อยภายในกลุ่ม ได้แก่ ประชากร Calabar, Tanzania และ Yangambi นอกนั้นมีความผันแปรภายในประชากรค่อนข้างสูง ดังเช่น ประชากร AVROS ตัวอย่างเช่น เมื่อทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย primer mEgCIR2215 ให้แถบดีเอ็นเอต่างกันถึง 4 แถบ คือ 100, 118, 120 และ 124 โดยในแต่ละแถบยังมีการกระจายตัวคือส่วนหนึ่งมีแถบ และอีกส่วนหนึ่งไม่มีแถบ ฉะนั้น การใช้ไพรเมอร์ร่วมกันหลายๆ ไพรเมอร์ จึงจะทำให้สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ของปาล์มน้ำมันได้ อย่างไรก็ตามเมื่อนำพ่อและแม่ของสุราษฎร์ธานี 1 – 8 มาตรวจสอบ alleles จากTable 3 พบว่าใช้ไพรเมอร์อย่างน้อย 3 คู่ คือ mEgCIR3428, mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 เพียงพอที่จะจำแนกพันธุ์ปาล์มน้ำมัน สุราษฎร์ธานี 1 – 8 ได้ สำหรับในกรณีที่มีความผันแปรภายในประชากรแต่ละพันธุ์อาจต้องใช้ไพรเมอร์อื่นร่วมด้วย คือ primer mEgCIR0804, mEgCIR3643 และmEgCIR3593 แต่เนื่องจาก mEgCIR3519 และ mEgCIR0874 ได้ขนาดของ alleles ใกล้เคียงกัน จึงอาจต้องมีการออกแบบปรับเปลี่ยนขนาดของ alleles ใหม่

ข้อมูลจากการการศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมครั้งนี้ ถูกเก็บไว้ในโปรแกรมเอกซ์เซล โดยเก็บในรูปขนาดความยาวและจำนวน alleles แต่ข้อมูลในรูปเอกซ์เซลนี้จะมีความยุ่งยากในการสืบค้นข้อมูล จึงได้พัฒนาระบบฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันขึ้น เพื่อรองรับการสืบค้น แก้ไข หรือเพิ่มเติมข้อมูล เช่น พันธุ์ใหม่ๆ และไพรเมอร์ที่เพิ่มขึ้น หรือเปรียบเทียบ alleles ระหว่างพันธุ์ได้ นอกจากนั้นยังนำข้อมูลนี้ไปศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันกลุ่มนี้ โดยการนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม แล้วนำไปเขียน Phylogenetic tree หรือ dendrogram ดังแสดงใน Figure 1 พบว่าสามารถแบ่งประชากรปาล์มน้ำมันออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ B ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่า 90% จะเห็นว่าในกลุ่ม A ประกอบด้วยพันธุกรรมของประชากร La Me ซึ่งความแตกต่างภายในประชากรขึ้นกับคู่ผสม คือ IRH 618 : 158T self กับ IRH618 : 26T self สำหรับกลุ่ม B สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อย C กับ D ซึ่งมีความต่างกันทางพันธุกรรม 70% ในกลุ่ม C มีประชากร Nigeria และCalabar ซึ่งมาจากคู่ผสมเดียวกันหรือพันธุกรรมใกล้กัน แต่มีชื่อต่างกัน ทั้งนี้ เนื่องมาจากถูกนำไปพัฒนาและคัดเลือกจากคนละสถานที่ คือ ที่เมือง Calabar, Aba, Ufama และ Benin ในประเทศไนจีเรีย (Rosenquist, 1985) ในกลุ่ม D ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยที่มีพันธุกรรมระหว่างกลุ่มย่อยแตกต่างกันมากกว่า 40% โดยที่กลุ่ม E มีประชากรกลุ่ม Yangambi แยกจาก Ghana และ Nigeria ในกลุ่มย่อย F ประกอบด้วยประชากร AVROS, Tanzania และ DAMI ซึ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม 20% หรือค่อนข้างใกล้ชิดกัน กลุ่มสุดท้ายคือ กลุ่มย่อย G ที่ประกอบด้วยประชากร Ekona, AVROS (คู่ผสม HC129:933T self) และประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นแม่พันธุ์ ก็ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่าประชากร Nigeria และ AVROS เมื่อวิเคราะห์แบบจัดกลุ่ม จะพบว่าถูกจัดอยู่ใน 2 กลุ่มคือ กลุ่ม C กับ G และ F กับ G ตามลำดับ ทั้งนี้เป็นผลมาจากพันธุกรรมของพ่อและแม่ที่ต่างกันมาก

จาก Figure 1 แสดงว่าความสัมพันธ์ของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผสมกันประชากรแม่พันธุ์ที่เป็น Deli Dura ซึ่งเมื่อนำไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มร่วมกับประชากรพ่อพันธุ์ Deli Dura จะมีความคล้ายกับประชากรในกลุ่ม AVROS มากที่สุดรองลงมาได้แก่ DAMI ฉะนั้นในการจะสร้างลูกผสมเทเนอรา ที่ได้จากการผสมต้นแม่ชนิด Deli Dura กับต้นพ่อพิสิเฟอรา ให้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง ต้องผสมพ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ๆ คือการผสม Deli Dura กับ La Me รองลงมาคือ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana จะเห็นว่าการใช้ไพรเมอร์ 13 คู่นี้สามารถจำแนกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อได้ดีมาก แต่เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอขนาดและจำนวน alleles ของประชากร Deli Dura ที่ใช้เป็นต้นแม่ 246 ต้น ข้อมูลจาก Table 3 คอลัมน์ Deli Dura เกือบทุกไพรเมอร์ ให้ alleles ขนาดเดียว ยกเว้นไพรเมอร์ mEgCIR0804 ให้ alleles ที่ต่างกัน 2 ขนาด คือ 195 และ 201 คู่เบส จะพบว่าไม่สามารถแยกความแตกต่างของประชากรต้นแม่ได้เลย จึงได้เลือกไพรเมอร์ชุดใหม่ สำหรับแยกความแตกต่างของประชากร Deli Dura อย่างเดียว พบว่า primer19 คู่ สามารถให้ polymorphic ของประชากร Deli Dura ได้ดีที่สุด ได้แก่ mEgCIR0246, mEgCIR0280, mEgCIR0445, mEgCIR0521, mEgCIR2332, mEgCIR3286, mEgCIR3298, mEgCIR3311, mEgCIR3383, mEgCIR3402, mEgCIR3555, mEgCIR3653, mEgCIR3655, mEgCIR3668, mEgCIR3684, mEgCIR3691, mEgCIR3705, mEgCIR3813 และ mEgCIR3869 ทำการคัดเลือกประชากร Deli Dura ที่เป็นตัวแทนทั้งหมด 96 ต้น มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า primer ทั้งหมด 19 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอ หรือ alleles ที่มีความแตกต่างกัน 44 แบบ สอดคล้องกับรายงานของ Mayer *et al*. (2001) ที่พบว่า ในประชากร Deli Dura ตรวจพบ alleles น้อยกว่าปาล์มอื่นๆ ถึง 36 alleles แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่น้อยกว่า พบว่ามีไพรเมอร์ 7 คู่ (mEgCIR0246, mEgCIR0445, mEgCIR3286, mEgCIR3298, mEgCIR3684, mEgCIR3691 และ mEgCIR3869) ให้ alleles ต่างกัน 3 แบบ ส่วนไพรเมอร์อื่นๆให้ alleles ที่ต่างกันเพียง 2 แบบเท่านั้นและส่วนใหญ่ให้ค่า heterozygosity ค่อนข้างต่ำ ดังแสดงใน Table 2 เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดเหล่านี้ไปวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มและทำ dendrogram (ไม่ได้แสดงภาพของผล) โดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า ฐานพันธุกรรมของ Deli Dura ระหว่างประชากรที่มีพ่อแม่ต่างกัน จะมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง และมีความแตกต่างกันน้อยภายในประชากร และไพรเมอร์ดังกล่าวนี้สามารถจำแนกประชากรปาล์มน้ำมันต้นแม่ชนิด Deli Dura ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่ม A (HC 133 : 1288 D self) และกลุ่ม B ที่ประกอบด้วยกลุ่มย่อย C (C2120 : 184D) D (C 2120 : 184D x DAM564 : 693D) และกลุ่มย่อย E (C2120 : 184D x MAR559 : 113D) สอดคล้องกับประวัติพันธุ์ของปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นแม่ชนิด Deli Dura พบว่านำมาจากแอฟริกาเมื่อปี 2391 และคัดเลือกมาจากปาล์ม 4 ต้น ที่ปลูก ณ สวนพฤกษศาสตร์ เมือง Deli ต่อมามีการผสมกับปาล์มน้ำมันกลุ่มอื่น ๆ เพื่อขยายฐานพันธุกรรมกว้างขึ้น

นอกจากนั้นยังพบว่าที่ศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานีมีการรวบรวมพันธุ์ลูกผสมข้ามชนิดหรือระหว่างสปีชีส์ (Interspecific hybridization)ระหว่างปาล์มน้ำมันพันธุ์แม่ Deli Dura (*Elaeis*

guineensis) กับ *E.oleifera* ซึ่งมีพันธุกรรมต้นเตี้ยจำนวน 12 คู่ผสม งานวิจัยนี้จึงได้ทำการสุ่มมาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอคู่ผสมละ 1 สายพันธุ์ โดยใช้ primer ชุดเดียวกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจำแนกพันธุ์และใช้เป็นตัวแทนในการศึกษาเปรียบเทียบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกลุ่มพันธุ์ Deli Dura พบว่าลูกผสม *E.guineensis* x *E.oleifera* มีความคล้ายคลึงกับกลุ่มพันธุ์ Deli Dura (CH133 x 1288D SELF) มากที่สุด และในปี 2555 ได้นำพันธุ์ปาล์มต้นเตี้ยและลูกผสมดังกล่าวที่รวบรวมไว้มาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพิ่มเติม สำหรับใช้ประโยชน์ในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันต้นเตี้ยต่อไป โดยจัดทำลายพิมพ์ DNA ของประชากรปาล์มน้ำมัน *E.guineensis* x *E.oleifera* จำนวน 150 ตัวอย่างพันธุ์ และปาล์มน้ำมันต้นเตี้ย (*E.oleifera*) จำนวน 32 ตัวอย่างพันธุ์ รวม 182 ตัวอย่างพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์เพิ่มเติมอีก 32 คู่ และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผลหาความหลากหลายทางพันธุกรรม และสามารถแยกความแตกต่างของประชากรปาล์มน้ำมัน พบแถบดีเอ็นเอหรือ alleles ที่มีความแตกต่างกัน 175 alleles รวมข้อมูล ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มนี้มี 5,824 ข้อมูล (records) ซึ่งได้ถูกนำไปเพิ่มในฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันรวมทั้งสิ้น 13,771 ข้อมูล เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์อย่างเป็นระบบต่อไป

II. การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน

จากการสกัดดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้งสามชนิดคือ ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา จำนวน 10 กลุ่ม พันธุ์ รวม 129 ตัวอย่างพันธุ์ แล้วนำไปทำปฏิกิริยา PCR เพื่อขยายยีนในหลอดทดลองของยีน MADS – box โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลผลิต PCR ชัดเจน ความยาวเท่ากันคือ 537 คู่เบส เมื่อนำผลผลิตของ PCR นี้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองทิศทาง คือ ทาง forward primer และ reverse primer แล้วนำผลที่ได้มาตรวจสอบยืนยันความถูกต้องของสายนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้องนี้ ไปทำการเปรียบเทียบกันมากกว่า 2 สาย (Multiple sequence alignment) พบว่า บริเวณของยีน MADS – box มีตำแหน่งสนิปส์หรือตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป 5 แห่ง คือ นิวคลีโอไทด์ ตำแหน่งที่ 220, 256, 272, 279 และ 308 ซึ่งแต่ละตำแหน่งเหล่านี้ยังสามารถบ่งชี้ชนิดของปาล์มน้ำมันในแต่กลุ่มได้ ดังนี้

1. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 220 (SNP_{Tan}) ปาล์มน้ำมัน Deli Dura และชนิดดูราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น C ขณะที่ชนิดพิสิเฟอราของ Tanzania มีนิวคลีโอไทด์เป็น G สำหรับชนิดเทเนอราของTanzania ก็จะเป็น heterozygous ที่ตำแหน่งนี้คือมีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองแบบ

2. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 256 (SNP_{DA}) พบว่า ดูราของ Deli Dura และ DAMI, DAMI Pisifera และ DAMI Tenera มีนิวคลีโอไทด์เป็น C , G , และ C/G ตามลำดับ

3. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 272 (SNP_{ENGC}) พบว่า ดูราของ Deli Dura, Ekona , Nigeria , Ghana และ Calabar มีนิวคลีโอไทด์เป็น T เหมือนกัน และพิสิเฟอราของปาล์มตระกูลเหล่านี้จะมี นิวคลีโอไทด์เป็น C ดังนั้น เทเนอรา ซึ่งเป็นheterozygous ของปาล์มเหล่านี้จะเป็น T/C

4. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 279 (SNP_{TaYa}) ที่จุดนี้ ดูราของDeli Dura Tanzania และYangambi จะมีนิวคลีโอไทด์เป็น A และจะเปลี่ยนเป็น T เมื่อเป็นพิสิเฟอรา ฉะนั้น เทเนอราของTanzania และ Yangambi จะมีทั้ง 2 นิวคลีโอไทด์ คือ A/T

5. ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์สุดท้ายที่พบ คือ 308 (SNP_{LaAv}) เป็นตำแหน่งสนิปส์ ที่กลุ่มพันธุ์ Deli Dura ปาล์มชนิดดูราของ La Me และAVROS เป็น C และพิสิเฟอราของกลุ่มเหล่านี้เป็น A ฉะนั้น เทเนอราของกลุ่มนี้จึงเป็น C/A ดังแสดงในFigure 2 จากภาพ ตำแหน่งในสายนิวคลีอิกแอซิดใด ๆ ที่ผันแปรมีนิวคลีโอไทด์ 2 แบบ ในตำแหน่งเดียวกันจะถูกแทนที่ด้วย IUB codes หรือ IUPAC anotation โดยที่ C/G จะถูกแทนที่ด้วยอักษร S (strong), A/C จะถูกแทนที่ด้วย M (aMino), A/T จะถูกแทนที่ด้วย W (weak) และ C/T จะถูกแทนที่ด้วย Y (pYrimidine) (IUPAC-IUB, 1970) การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ทั้ง 5 ตำแหน่งดังกล่าวข้างต้น ได้ทำการตรวจสอบยืนยันซ้ำจากกราฟของสายนิวคลีโอไทด์ (electropherogram) ที่ได้จากการอ่านลำดับพันธุกรรมของดีเอ็น (DNA Sequencing) แสดงในFigure 3 (a)-(e) และในTable 4 ได้แสดงข้อมูลตำแหน่งสนิปส์ที่ใช้ในการตรวจชนิดพันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้ง 10 กลุ่มพันธุ์ ได้แก่ Deli Dura, DAMI, Ekona, Ghana, La Me, Nigeria, Tanzania, Yangambi, AVROS และ Calabar ชนิดของผล (Fruit Type) และจำนวนตัวอย่างที่นำไปอ่านลำดับพันธุกรรม

Singh *et al.*(2013) ได้รายงานว่า พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งแรกเป็นของ Congo (AVROS) และ Tanzania สอดคล้องกับตำแหน่ง SNP_{TaYa} ของการศึกษาครั้งนี้ แต่แตกต่างกันตรงที่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ AVROS ในตำแหน่งนี้ กลับพบในตำแหน่ง SNP_{LaAv} สำหรับสนิปส์ตำแหน่งที่สองพบในกลุ่มพันธุ์ Nigeria สอดคล้องตรงกับตำแหน่ง SNP_{ENGC} ของรายงานฉบับนี้ ซึ่งจากการทดลองนี้มีการพบว่าตำแหน่งนี้ นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ (SNP) ของ Nigeria แล้ว ยังพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ กลุ่ม Ekona Ghana และ Calabar ด้วย อนึ่งจากผลของการอ่านลำดับ นิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน MADS-box ครั้งนี้ พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มเติมอีก 3 แห่ง ซึ่งเป็นรายงานครั้งแรกยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน คือ SNP_{Tan} SNP_{DA} และ SNP_{LaAv} สามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันได้

Singh *et al.*(2013) ได้กล่าวถึงเหตุผลเพิ่มเติมว่าการเปลี่ยนแปลงของหนึ่งนิวคลีโอไทด์ ในส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน จาก Leucine เป็น proline และ lysine เป็น asparagines ที่ในบริเวณ Conserved DNA binding และ dimerization domain ของยีน MADS-box และคาดว่ากรดอะมิโน ตัวใหม่ไม่สามารถจะจับตัวกับโปรตีนนั้น เพื่อสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมัน จึงทำให้ผลชนิดพิสิเฟอราไม่มีกะลา การทดลองครั้งนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ ในช่วงที่ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นลำดับโปรตีน (Protein sequence) โดยใช้โปรแกรม ExPASy พบว่าตำแหน่ง สนิปส์หรือตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของ codon ในบริเวณ MADS-box ยีนของปาล์มน้ำมันที่พบ 5 แห่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนกรดอะมิโนทุกตำแหน่ง ดังแสดงใน Figure 4

การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเหล่านี้ เกิดขึ้นในบริเวณเดียวกับที่ถูกรายงานโดย Singh *et al.*(2013) จึงสามารถวิเคราะห์ได้ว่า กรดอะมิโนตัวที่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในบริเวณ Conserved DNA binding และ dimerization domain ของยีน MADS-box การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกรดอะมิโนทำให้โปรตีนที่เกิดขึ้นนั้นไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ทำให้การสร้างกะลา (Shell) ของปาล์มน้ำมันเกิดความผิดปกติ เป็นผลให้ผลปาล์มน้ำมันชนิดพิสิเฟอราไม่มีกะลา

III. การตรวจวิเคราะห์แยกชนิดของปาล์มน้ำมัน โดย Real Time PCR

3.1 ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตรวจสนิปส์ ออกแบบไพรเมอร์และโพรบสำหรับตำแหน่งสนิปส์ที่พบแต่ละตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม TaqMan Probe and primer chemistry and design ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์และโพรบ ซึ่งติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM ของทั้ง 4 ตำแหน่ง คือ SNP_{DA} , SNP_{ENGC}, SNP_{TaYa} และ SNP_{LaAv} สำหรับ SNP_{Tan} ตรวจสนิปส์ของปาล์มน้ำมันกลุ่ม Tanzania ไม่ได้ทำการออกแบบโพรบและไพรเมอร์ไว้เพราะสามารถใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP_{TaYa} ได้เช่นกัน ดังFigure 5 เป็นการแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ โพรบและการติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ สี VIC และ FAM ทางด้าน 5’ ของโพรบ ทั้ง 2 สาย สำหรับปลาย 3’ ของโพรบติดด้วย Quencher ซึ่งจะเป็นส่วนควบคุมไม่ให้สี VIC และ FAM มีการแสดงออกถ้ายังติดอยู่กับสายโพรบ ทางทิศทางนี้ยังมี Miner groove binder (MGB) เพื่อช่วยให้สายโพรบเกาะกับ DNA helix ให้ดีขึ้น

3.2 การตรวจแยกชนิดปาล์มน้ำมันของศูนย์วิจัยปาล์มน้ำมันสุราษฎร์ธานี

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มที่สกัดดีเอ็นเอไว้แล้ว จำนวน 129 ตัวอย่าง พันธุ์ ที่ทราบประวัติพันธุ์และมีการพิสูจน์ทราบแล้วว่าเป็นปาล์มน้ำมันชนิดใดบ้าง เพื่อยืนยันความใช้ได้ของไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ตามข้อ 3.1 ผลการตรวจวิเคราะห์จาก Allelic Discrimination ให้ข้อมูลชนิดของพันธุ์เป็น ดูรา พิสิเฟอรา และ เทเนอรา ถูกต้องทุกพันธุ์ จากFigure 6 (a) เป็นการตรวจปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ AVROSโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบของ SNP $_{LaAv}$ (C/A) ใน Amplification plot จะเห็นว่าสีฟลูออเรสเซนต์ VIC กับ FAM จะขึ้นให้เห็นในรอบที่ 24-26 ของเครื่อง Real Time PCR เมื่อทำการวิเคราะห์ผลใน Discrimination plot ก็ให้ผลที่ถูกต้อง ในFigure 6 (b) เป็นผลการตรวจวิเคราะห์ปาล์มน้ำมันของ Tanzania และ La Me โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{TaYa} (A/T) และ SNP_{LaAv} (C/A) ตามลำดับ แต่เมื่อลองใช้ไพรเมอร์และโพรบ SNP_{Da} (C/G) มาตรวจประชากรทั้ง 2 กลุ่ม จะพบการกระจายของ allele ใน Allele Discrimination plot กระจัดกระจายไม่สามารถอ่านผลได้

3.3 การตรวจแยกชนิดของปาล์มน้ำมันบริษัทเอกชน

ผลการใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบและสังเคราะห์ขึ้น มาตรวจปาล์มของบริษัทเอกชน ได้แก่ บริษัท โกลเด้น เทเนอรา จำกัด, บริษัทยูนิวานิช น้ำมันปาล์ม จำกัด และบริษัท ทักษิณปาล์ม ซึ่งปลูกไว้ที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี จำนวน 60 ตัวอย่าง พบว่า พันธุ์ปาล์มน้ำมันทั้งหมดเป็นชนิดเทเนอรา แต่การเก็บตัวอย่างครั้งนี้พบปาล์มสายพันธุ์ Compact ของบริษัท อาร์ แอนด์ ดี เกษตรพัฒนา ซึ่งยังไม่เคยมีประวัติพันธุ์ จึงจะต้องนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

IV. ผลการพัฒนาวิธีการตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันให้รวดเร็วขึ้น

ผลจากการตัดปลายใบเป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ใส่ถุงที่มีน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร แล้วใช้ค้อนขูดใบปาล์มน้ำมันจากภายนอกถุงให้น้ำเป็นสีเขียวอ่อน แล้วดูดใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตรที่มี Dilution buffer อยู่ 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปทำ PCR พบว่าได้ผลผลิต PCR การสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มวิธีนี้สะดวกและรวดเร็วมาก ได้ทดลองนำน้ำใสส่วนบนที่สกัดได้ไปตรวจวิเคราะห์ชนิดของปาล์มโดยใช้ไพรเมอร์กับโพรบที่ออกแบบไว้บนเครื่อง Real time PCR ปรากฏว่าไม่มีผลผลิตของ PCR เลย แม้จะตั้งเครื่อง Real time PCR ถึง 50 รอบแล้วก็ตาม ดังนั้น จึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้อย่างรวดเร็วข้างต้น 1 ไมโครลิตร ไปทำ Nested PCR ก่อน โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ซึ่งสามารถจะขยายยีนในส่วนที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ได้ทุกพันธุ์ ก่อนจำนวน 25, 30, 35 และ 40 รอบ จากนั้นเจือจางผลผลิตของ PCR 500 เท่า จึงนำไปตรวจวิเคราะห์ ชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ไพรเมอร์และโพรบที่ออกแบบไว้ สำหรับตรวจสนิปส์ ปรากฏว่า การทำ Nested PCR 35 กับ 40 รอบ ตรวจพบผลผลิต PCR เร็วมากในรอบที่ 14-18 แต่เมื่อวิเคราะห์ผลใน Allelic Discrimination plot พบว่าผลการวิเคราะห์กระจัดกระจาย ไม่สามารถสรุปผลได้ แต่การทำ Nested PCR 30 รอบ ให้ผลดีที่สุดไม่แตกต่างจากการใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี CTAB การพัฒนาวิธีการตรวจนี้ทำให้ผู้ปฏิบัติทำงานได้สะดวก รวดเร็วขึ้นมาก

V. การพัฒนาวิธีตรวจสนิปส์เพื่อแยกชนิดของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง PCR ทั่วไป

จากการออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจสนิปส์ทั้ง 4 แห่ง เพื่อจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมัน เมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของไพรเมอร์พบว่าสามารถตรวจสนิปส์ได้ดี 3 ตำแหน่ง ดังนี้

ตำแหน่ง SNP_{DA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Mut218-D-F1 5′CGGCAGGTCACTTTCTGCAA**GC** 3′, Mut218-D-R1 5′GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3′ และ Mut218-P-F1 5′CGGCAGGTCACTTTCTGCAA**GG** 3′, Mut218-P-R 5′TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3′ ไพรเมอร์คู่แรกในตำแหน่งนี้ให้ผลผลิตของ PCR ขนาด 200 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิดดูราและเทเนอรา ไม่ให้ผลกับพิสิเฟอรา ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ ผลผลิต PCR ขนาด 276 คู่เบส กับปาล์มน้ำมัน DAMI ชนิด พิสิเฟอรา กับ เทเนอรา แต่ไม่ได้ให้ผลกับดูรา ดังแสดงในFigure 7 (a)

ตำแหน่ง SNP_{TAYA} ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ Mut106-D-F3 5′GCCGAAATGGACTGCTGAAG**TAA** 3′ Mut106-D-R1 5′GCTTGGCCATAGAACAAATGAAGC 3′ และ Mut106-P-F1 5′GCCGAAATGGACTGCTGAAG**GAT** 3′ Mut106P-P-R 5′ TTTGGATCAGGGATAAAAGGGAAGC 3′ โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ นี้ สำหรับตรวจสนิปส์

ของปาล์มน้ำมัน Tanzania กับ Yangambi โดยที่ไพรเมอร์คู่แรกให้ผลผลิต PCR ขนาด 172 คู่เบส กับ ดูรา และ เทเนอรา และ ไพรเมอร์คู่ที่สองให้ผลผลิต PCR กับ พิสิเฟอรา กับ เทเนอรา ขนาด 264 คู่เบส แสดงในFigure 7 (b) สำหรับสนิปส์ในตำแหน่ง SNP_{LaAv} และ SNP_{ENGC} การออกแบบไพรเมอร์เพื่อตรวจชนิดของปาล์มน้ำมันโดยใช้ PCR ทั่วไปยังไม่สำเร็จต้องทำการทดสอบปรับสภาวะการทำ PCR หรือออกแบบไพรเมอร์ คู่ใหม่เพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ได้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite จำนวน 13 คู่ที่เหมาะสำหรับใช้จำแนกและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมันที่ใช้เป็นต้นพ่อและต้นแม่รวม 10 กลุ่มพันธุ์ (Deli Dura, AVROS, Yangambi, Nigeria, Calabar, Ghana, Ekona, DAMI, Tanzania และ La Me) พบว่า La Me มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากประชากรกลุ่มอื่น ๆ มากที่สุด รองลงมาได้แก่ Calabar, Nigeria, Tanzania และ Ghana สำหรับกลุ่ม AVROS มีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกับ Deli Dura ที่ใช้เป็นประชากรแม่มากสุด รองลงมาคือ DAMI แต่เครื่องหมายโมเลกุล 13 คู่นี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในประชากรแม่พันธุ์ Deli Dura ได้ จึงค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมอีก 19 คู่ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอภายในประชากร Deli Dura ได้ถึง 44 alleles นอกจากนี้ยังได้เครื่องหมายโมเลกุลอีก 32 คู่ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันต้นเตี้ยที่เป็นลูกผสมระหว่างสปีชีส์ (*E.guineensis x E.oleifera*) จำนวน 182 ตัวอย่างพันธุ์ ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 13,771 ข้อมูล แสดงในรูปความยาว alleles ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน สำหรับใช้ในการสืบค้น จำแนก ตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ และใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ได้

จากการใช้เทคนิคสนิปส์ตรวจสอบยีน MADs-box สำหรับแยกชนิดของปาล์มน้ำมัน พบสนิปส์ 5 ตำแหน่งที่สามารถจำแนกประชากรแม่พันธุ์ดูรา พ่อพันธุ์พิสิเฟอรา และลูกผสมเทเนอรา ทั้งหมดที่ศึกษาได้ดังนี้คือ สนิปส์ SNP_{ENGC} (T/C), SNP_{TaYa} (A/T), SNP_{DA} (C/G), SNP_{LaAv} (C/A) และ SNP_{Tan} (C/ G) สำหรับสนิปส์ 3 ตำแหน่งหลังเป็นการค้นพบครั้งแรกในการศึกษานี้

นอกจากนั้นยังประสบความสำเร็จในการออกแบบโพรบและไพร์เมอร์สำหรับตรวจสอบปาล์น้ำมันชนิด ดูรา พิสิเฟอรา และเทเนอรา โดยใช้เครื่อง Real-Time PCR ตลอดจนไพร์เมอร์ 2 คู่ที่ใช้กับเครื่อง PCR ทั่วไป

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์เพื่อควบคุมคุณภาพกล้าพันธุ์ปาล์มน้ำมันรองรับ พรบ.คุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ.2542 โดยคัดแยกต้นดูราออกจากลูกผสมเทเนอรา

2. สร้างแปลงพันธุ์พ่อชนิด พิสิเฟอรา ซึ่งได้จากการผสมข้ามระหว่างต้นเทเนอรา ด้วยกันจะได้ต้นปาล์มน้ำมันชนิด ดูรา เทเนอรา และพิสิเฟอรา ในอัตรา 1:2:1 คละกัน แต่เดิมต้องนำไปปลูกหมด

เพราะการแยกชนิดทำไม่ได้ในระยะต้นกล้า ต้องตรวจสอบเมื่อติดผลแล้วเท่านั้น ทำให้สิ้นเปลืองเนื้อที่ แรงงานและค่าใช้จ่ายตลาดจนเวลาในการดูแลรักษา และต้นพ่อพันธุ์พิสิเฟอราอยู่กระจัดกระจาย การรวบรวมเกสรทำได้ยาก แต่ถ้าใช้เทคโนโลยีที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถเลือกต้นพิสิเฟอราที่มีเพียง 25% ทำให้สามารถนำไปปลูกติดกันประหยัดทั้งเนื้อที่ แรงงาน งบประมาณ และการดูแลรักษา

3. เทคนิคการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์และตรวจลูกผสม Tenera ในระยะกล้าสามารถใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ กรณีมีการฟ้องร้องเรื่องชนิดของกล้าพันธุ์และความตรงตามพันธุ์ ได้

4. ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความหลากหลายของปาล์มน้ำมัน สำหรับใช้สืบค้นในการจำแนกพันธุ์ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและปรับปรุงพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการปาล์มน้ำมัน. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 188 หน้า

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร : ปาล์มน้ำมัน.2556 การผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ แหล่งที่มา: http://www.oac.go.th/downlood /prcai/jarmerop/Palm.pdf, สืบค้นเมื่อ ธ.ค.2557

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ อรรัตน์ วงศ์ศรี บุญเรือน เรืองวิเศษ พยุงศักดิ์ รวยอารี และ ประสาน สืบสุข. 2548. โครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันสุราษฎ์ธานี 1, 2 และ 3 โดยใช้เทคนิค AFLP. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย กรุงเทพฯ. 30 หน้า.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Chkerospondias asillaris.* BioLect. Biodiv. Lett. 2 : 19-24.

Alvarado, A.and F. sterling.2005. Shesstoleramt oil palm vaicties. ASD al Palm Papers 28:5-20

Anonymous. 1997. Gene Scan Reference Guide Chemistry Reference for The ABI Prism 377 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems. Division of Perkin – Elmer. International Union of Pure and Applied Chemistry : 8-1 – 8-33.

Billotte N, Risterucci AM, Barcelos E, Noyer JL, Amblard P, Baurens FC (2001) Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) microsatellite markers. Genome 44:413–425

Billotte N, Æ N. Marseillac, Æ A.-M. Risterucci, B. Adon Æ , P. Brottier Æ, F.-C. Baurens, Æ R. Singh, A. Herra´ n Æ, H. Asmady Æ, C. Billot Æ, P. Amblard,T. Durand-Gasselin Æ, B. Courtois Æ, D. Asmono, S. C. Cheah Æ W. Rohde Æ E. Ritter Æ and A. Charrier 2005. Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). Theor Appl Genet (2005) 110: 754–765 หรือ Received: Published online: 26 January 2005 Springer-Verlag 2005

IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN).1970. Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides and their constituents. Biochem J. 120(3):449-54. หรือ http://www.biochemj.org/bj/120/0449/1200449.pdf

Jehan T and S.Lakhanpaul, 2006. Single nucleotide polymorphism (SNP) Method and applications in plant genetics : A review: Indian Journal Biotechnology. Vol 5(October) : 435-459.

L Low, E.T., H. Alias, S.H. Boon, E. M Shariff, C.Y. A Tan, L. CL Ooi, S.C. Cheah, A.R. Raha, K.L. Wan and R. Singh. 2008. Oil palm (*Elaieis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. BMC Plant Biology 8: 62.

Liu, J., S. Huang, M. Sun, S. Liu, Y. Liu, W. Wang, X. Zhang, H. Wang and W. Hua.2012. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. Plant Methods 8(1): 34.

Maizura, I., N. Rajanaidn, A.H. Zakri and S.C. Cheah. 2004. Assessment of Genetic Diversity in Oil Palm (*Elaieis guineensis* Jacq.) using Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Genetic Resources and Crop Evolution 53 (1): 187-195.

Mayer, Jack and Corley. 2001. The use of molecular marker to investigate the genetic structure of oil palm breeding program. Heredity 85 (3): 288-293.

Orum H1, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O and Stanley C. 1993. Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. Nucleic Acids Res. (23):5332-6.

Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. 2002. Curr Opin Plant Biol. (2):94-100.

Rosenquist, E.A.1985.The genetic base of Oil Palm breeding populations. Proceeding of International Workshop on oil palm Germplasm and Utilization. Palm oil Petrarch Institute of Malaysia. PI2756

Singh, R., ET. Low, LC. Ooi, M. Ong-Abdullah, NC. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, MD. Amiruddin, R. Rosli, MA. Manaf, KL. Chan, MA. Halim, N. Azizi, N. Lakey, SW. Smith, MA. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A .Van Brunt, C. Wang, JM. Ordway, R. Sambanthamurthi and RA. Martienssen. 2013.The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. Nature 500(7462):340-4.

Ting NC, Zaki NM, Rosli R, Low ET, Ithnin M, Cheah SC, Tan SG and Singh R. 2010. SSR mining in oil palm EST database: application in oil palm germplasm diversity studies. J Genet 89 (2):135-45.

Table 1 Size and number of alleles per locus (Primer) and actual heterozygosity of oil palm Deli Dura, different male parent populations**,** DOA's recommended oil palm varieties (Surat Thani 1-8) of 246, 151 and 74 plants, respectively. The samples were amplified with 13 SSR primers.

No.	Primer	Size of alleles (Base pair)	No. of alleles	Heterozygosity
1	mEgCIR007	118, 120, 122, 124, 126, 128 , 130	7	0.13
2	mEgCIR017	112, 114, 118, 134 , 140	5	0.09
3	mEgCIR080	191, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209 , 211	10	0.09
4	mEgCIR342	157, 159, 165, 167, 169, 171 , 181	7	0.11
5	mEgCIR364	167, 171, 175, 183, 185, 187 , 197	7	0.26
6	mEgCIR364	134, 136, 144, 146, 148 , 154	6	0.16
7	mEgCIR369	164, 166, 172, 174 , 182	5	0.10
8	mEgCIR087	215, 217, 221, 231, 235, 237, 239, 247, 249, 255 257	11	0.14
9	mEgCIR221	100, 112, 114, 116, 118, 120, 124, 128 , 130	9	0.25
10	mEgCIR257	71, 87, 89, 93, 103, 105 , 107	7	0.26
11	mEgCIR351	216, 222, 232, 234, 240, 242 , 250	7	0.23
12	mEgCIR359	146, 152, 154, 162, 168, 172 , 174	7	0.05
13	mEgCIR375	230, 238, 246, 250, 256, 258 , 262	7	0.19
		Total	95	

Table 2 Size and number of alleles per locus and actual heterozygosity of 96 plants from Deli Dura female parent. The breeding materials were collected in the area of Surat Thani oil palm Research Center. The data were derived by 19 SSR primers respectively.

No.	Primer	Size of alleles (Base pair)	No. of alleles	Heterozygosity
1	mEgCIR0246	261, 265, 291	3	0.55
2	mEgCIR0280	214, 246	2	0.49
3	mEgCIR0445	352, 362, 366	3	0.47
4	mEgCIR0521	131, 137	2	0.23
5	mEgCIR2332	220, 236	2	0.34
6	mEgCIR3286	120, 130, 138	3	0.19
7	mEgCIR3298	110, 130, 146	3	0.45
8	mEgCIR3311	100, 108	2	0.67
9	mEgCIR3383	185, 199	2	0.38
10	mEgCIR3402	193, 215	2	0.18
11	mEgCIR3555	237, 259	2	0.26
12	mEgCIR3653	118, 122	2	0.29
13	mEgCIR3655	181, 191	2	0.36
14	mEgCIR3668	117, 141	2	0.36
15	mEgCIR3684	90, 94, 106	2	0.32
16	mEgCIR3691	174, 184, 188	3	0.38
17	mEgCIR3705	166, 176	2	0.25
18	mEgCIR3813	160, 168	2	0.45
19	mEgCIR3869	130, 140, 144	3	0.50
		Total	44	

Table 3 Summary of alleles size and allele numbers obtained from 471 oil palm samples in 10 population types. The samples were amplified with 13 SSR primers.

Primer	Alleles size (Base pair)	Female parent	male parent								
		Deli Dura	AVROS	Carabar	Dami	Ekona	Ghana	La Me	Nigeria	Tansania	Yangambi
mEgCIR0074	118	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	120	+	+/-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
	122	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	124	-	-	-	-	+/-	+	-	-	-	+
	126	-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	130	-	-	+	-	-	-	-	+/-	-	-
mEgCIR0173	112	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-
	114	+	+/-	-	+	+	-	-	-	-	+
	118	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	134	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	140	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
mEgCIR0804	191	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	195	+/-	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
	197	-	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-
	199	-	+/-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-
	201	+	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-
	203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	205	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
	207	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	209	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	211	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
mEgCIR3428	157	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	159	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	165	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	167	-	-	-	-	-	+	-	+/-	-	-
	169	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	+	-
	171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	181	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
mEgCIR3641	167	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	171	-	-	+	-	-	-	-	+/-	+/-	-
	175	-	+/-	-	-	+/-	+	-	-	-	+/-
	183	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	185	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
	187	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	197	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-
mEgCIR3643	134	-	+/-	+	-	+/-	+	+/-	+/-	-	-
	136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	144	+	+/-	-	+	+/-	-	-	-	+	-
	146	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	148	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	154	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
mEgCIR3698	164	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
	166	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	172	+	+/-	-	+/-	+	-	+/-	-	-	+
	174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	182	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-	+	-
mEgCIR0874	215	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	217	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	221	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	231	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	235	+	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-	-
	237	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	239	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-
	247	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	249	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	255	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	257	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
mEgCIR2215	100	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	+	-
	112	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	+
	114	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-	-	-
	116	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	118	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-
	120	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-
	124	+	+/-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
	128	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	130	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
mEgCIR2577	71	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	87	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	89	+	+/-	-	+	+/-	-	+	+/-	-	-
	93	+	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-
	103	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	105	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
	107	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mEgCIR3519	216	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
	222	-	+/-	+	+/-	+/-	-	-	+	-	+
	232	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	234	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
	240	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	242	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	250	+	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-
mEgCIR3593	146	-	-	+	-	+/-	-	-	+	-	+
	152	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	154	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	162	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	168	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	172	+	+/-	-	+	+/-	-	-	-	-	-
	174	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
mEgCIR3755	230	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	238	-	+/-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	-
	246	+	+	+	+	+/-	-	-	+/-	-	+/-
	250	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
	256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	262	-	-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-

annotation + = present
- = absent

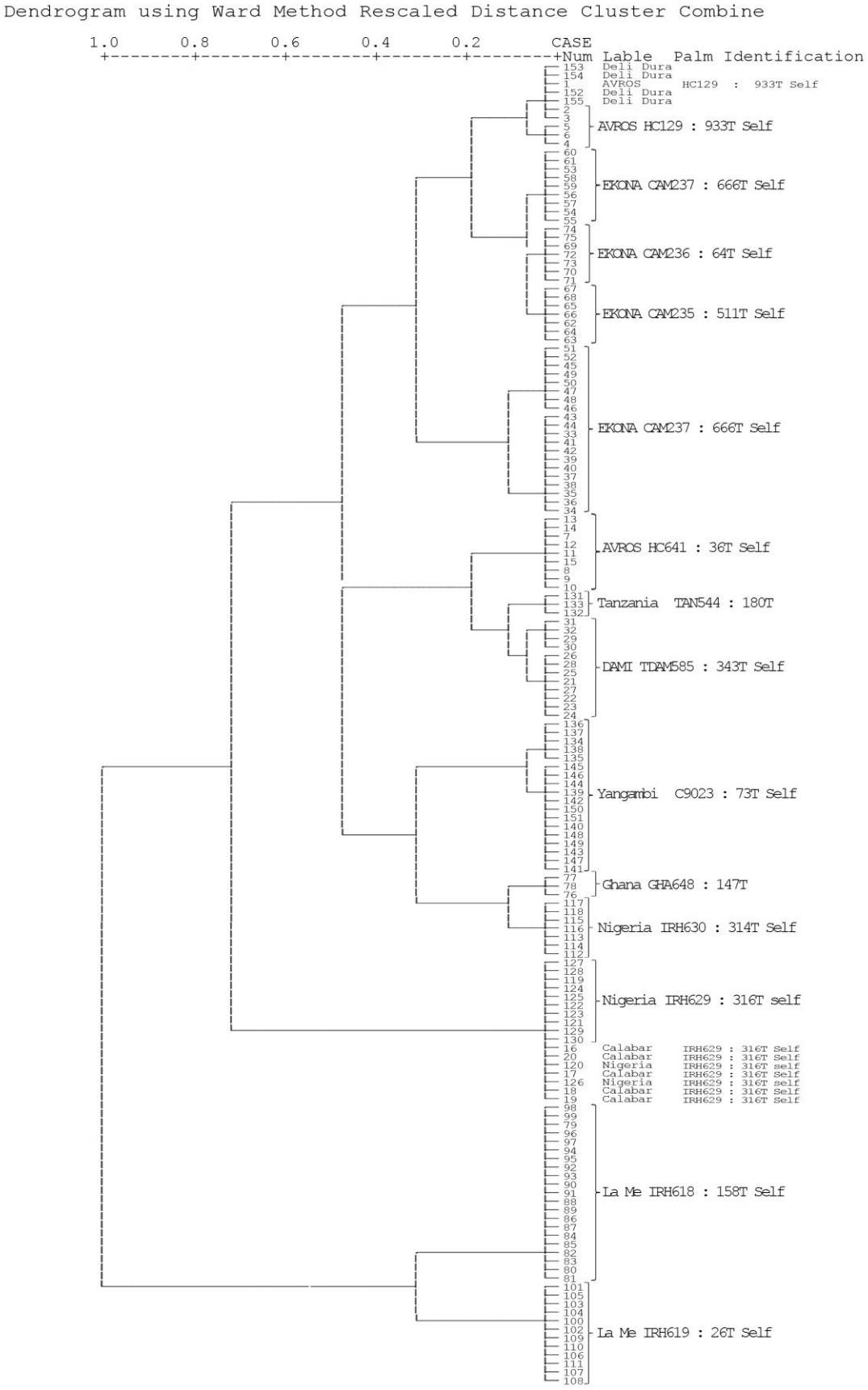
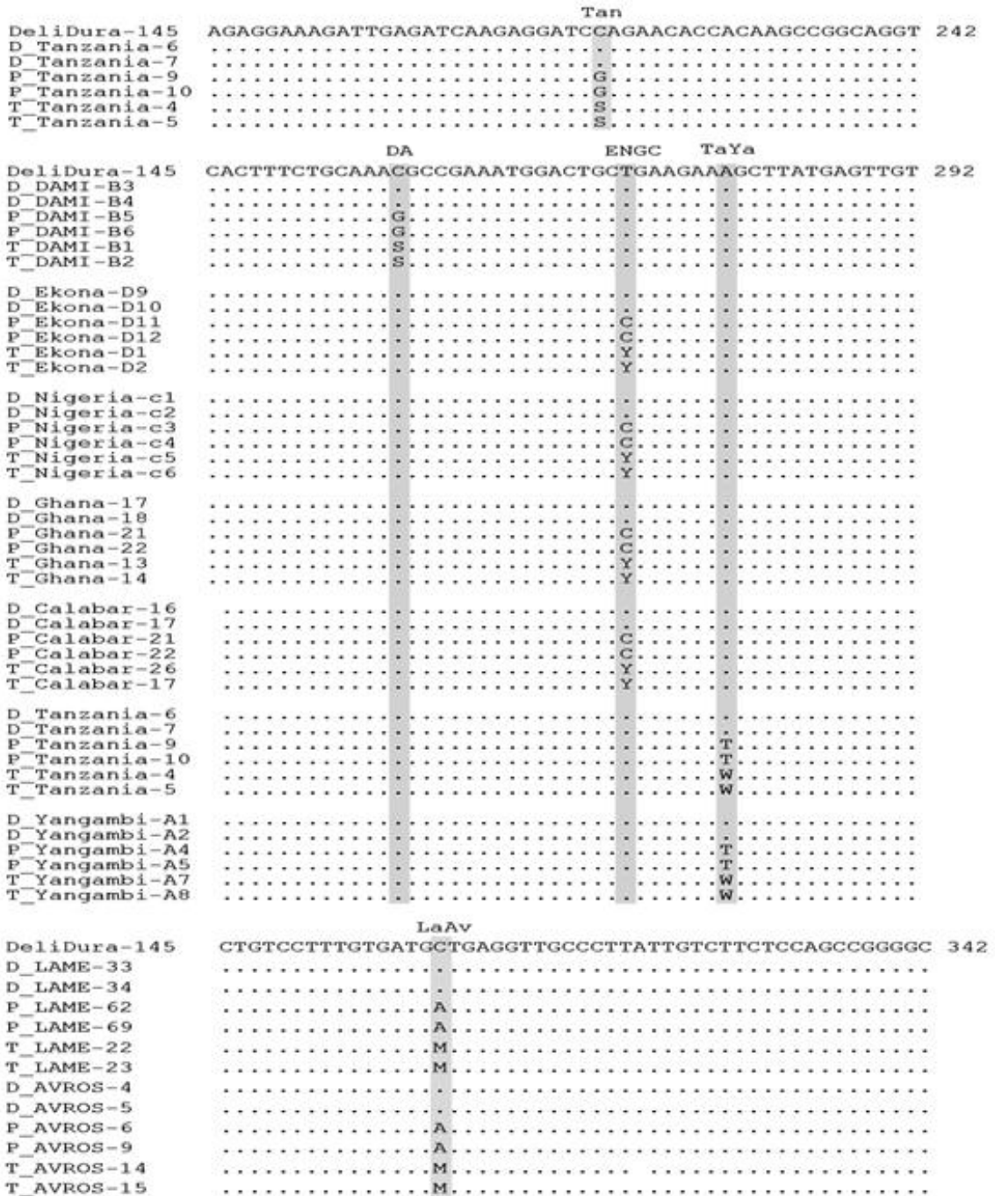


Figure 1 The genetic relationship of 151 samples from 9 distinct male parent populations included 4 samples of Deli Dura female parent, use as breeding materials. The dendrogram was generated by similarity matrix data of 13 SSR primers.



Note: C/G = S(Strong-3H bonds), A/C = M(aMimo), A/T = W(Weak-2H bonds), C/T = Y(pYrimidine)

Figure 2 Multiple sequence alignment of oil palm MADS-box gene in three shell types (Dura, Pisifera, Tenera) of 10 distinct oil palm populations. The five polymorphic SNPs position were identified as follow, SNP_{Tan} ; a nucleotide "C" in Deli and Tanzania dura is substituted with nucleotide "G" in Tanzania pisifera, SNP_{DA} ; a nucleotide "C" in Deli and DAMI dura is substituted with nucleotide "G" in DAMI pisifera, SNP_{ENGC} ; a nucleotide "T" in Deli, Ekona, Nigeria, Ghana and Calabar dura is substituted with nucleotide "C" in Ekona, Nigeria, Ghana and Calabar Pisifera, SNP_{TaYa} ; a nucleotide "A" in Deli, Tanzania and Yangambi dura is substituted with nucleotide "T" in Tanzania and Yangambi Pisifera, SNP_{LaAV} ; a nucleotide "C" in Deli, La Me and AVROS dura is substituted with nucleotide "A" in La Me and AVROS Pisifera.

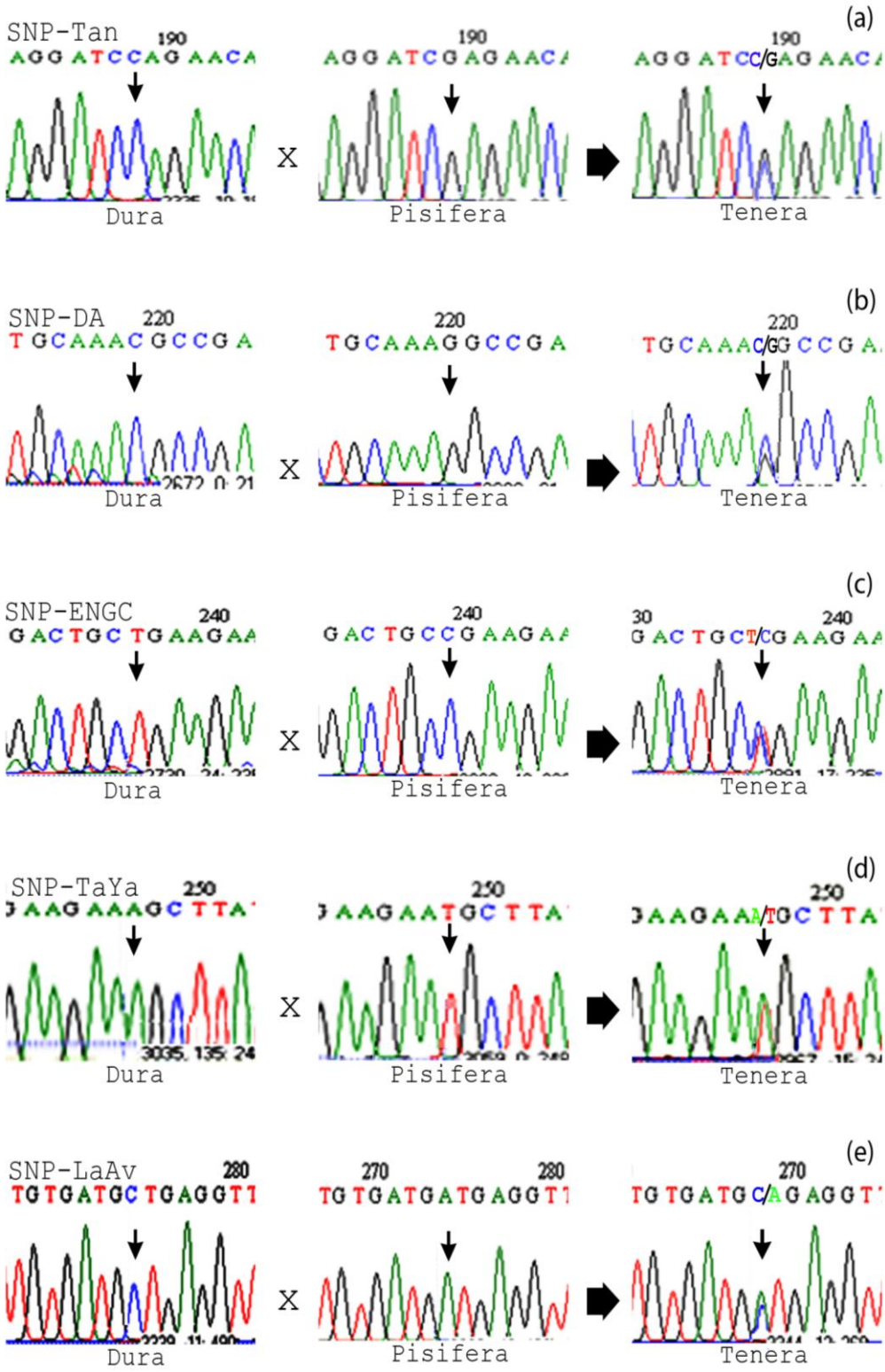


Figure 3 The electropherogram of MADS-box gene sequences of each SNP position showed a nucleotide substitution (black arrow) between dura and pisifera oil palm, (a) SNP_{Tan} (C/G); (b) SNP_{DA} (C/G); (c) SNP_{ENGC} (T/C); (d) SNP_{TaYa} (A/T); (e) , SNP_{LaAV} (C/A). Two electropherogram peaks at the same position were observed in tenera sequences.

Table 4 Summary of 5 SNPs positions for genotyping oil palm shell type. Data were generated from nucleotide sequences of MADS-box gene from 10 oil palm populations, total 129 plant samples.

Type	Fruit Type	No. of samples	SNP_{Tan}	SNP_{DA}	SNP_{ENGC}	SNP_{TaYa}	SNP_{LaAV}	reference
Deli Dura	Dura	6	C	C	T	A	C	
Dami	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	3	G	G	T	A	C	
	Tenera	3	G	**C/G**	T	A	C	
Ekona	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	4	G	C	**T/C**	A	C	
Ghana	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	4	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	**T/C**	A	C	
La Me	Dura	13	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	13	G	C	T	A	A	
	Tenera	11	G	C	T	A	**C/A**	
Nigeria	Dura	3	G	C	T	A	C	Singh *et al.* 2013
	Pisifer	3	G	C	C	A	C	
	Tenera	3	G	C	**T/C**	A	C	
Tansania	Dura	4	C	C	T	A	C	1.Singh *et al.* 2013
	Pisifer	4	G	C	T	T	C	
	Tenera	4	**C/G**[2]	C	T	**A/T**[1]	C	2. This study
Yangambi	Dura	3	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	3	G	C	T	T	C	
	Tenera	2	G	C	T	**A/T**	C	
AVROS	Dura	4	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	4	G	C	T	A	A	
	Tenera	4	G	C	T	A	**C/A**	
Calabar	Dura	5	G	C	T	A	C	This study
	Pisifer	5	G	C	C	A	C	
	Tenera	5	G	C	**T/C**	A	C	

```
ATG   GGT   AGA   GGA   AAG   ATT   GAG   ATC   AAG   AGG   ATC  (C/G)AG  AAC
M     G     R     G     K     I     E     I     K     R     I    Q/E     N

ACC   ACA   AGC   CGG   CAG   GTC   ACT   TTC   TGC   AAA  (C/G)GC  CGA  AAT
T     T     N     R     Q     V     T     F     C     K    R/G     R    N

GGA   CTG C(T/C)G AAG AA(A/T) GCT   TAT   GAG   TTG   TCT   GTC   CTT  TGT
G     L    L/P    K     K/N   A     Y     E     L     S     V     L    C

GAT G(C/A)T GAG
D    A/D    E
```

Figure 4 The nucleotide sequence encoded MADS-box gene was translated to peptide sequence. A nucleotide substitution (highlighted in gray) in each codon results in amino acid change (highlighted in yellow) which related to oil palm dura and pisifera shell type, as follows;
Dura; (C)AG = Q (Glutamine), (C)GC = R (Argimine), C(T)G = L (Leucine), AA(A) = K (Lysine), G(C)T = A (Alanine)
Pisifera; (G)AG = E (Glutamic acid), (G)GC = G (Glycine), C(C)G = P (Proline), AA(T) = N (Asparagines), G(A)T = D (Aspartic acid)

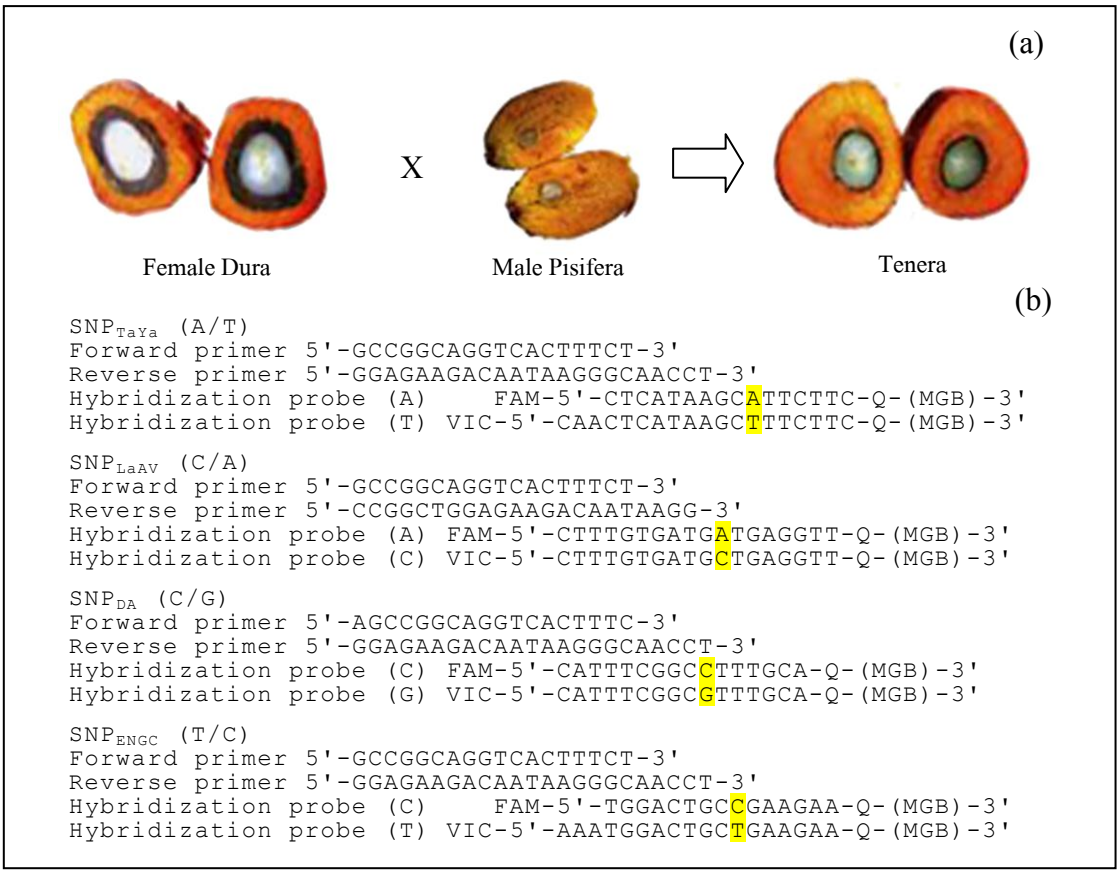


Figure 5 Probes and primers used in SNP genotyping analysis for determining oil palm shell type. (a) Showed the shell type of commercial hybrid tenera (Thin) derived from cross between female dura (Thick) and male pisifera (no shell). (b) Two specific hybridization probes were designed from polymorphic nucleotide of each SNP position (highlighted in yellow). The probe was separately labeled by fluorescent dye FAM® or VIC® color at the 5' end. Quencher (Q) and Minor Groove binder (MGB) were incorporated at the 3' end of all probes.

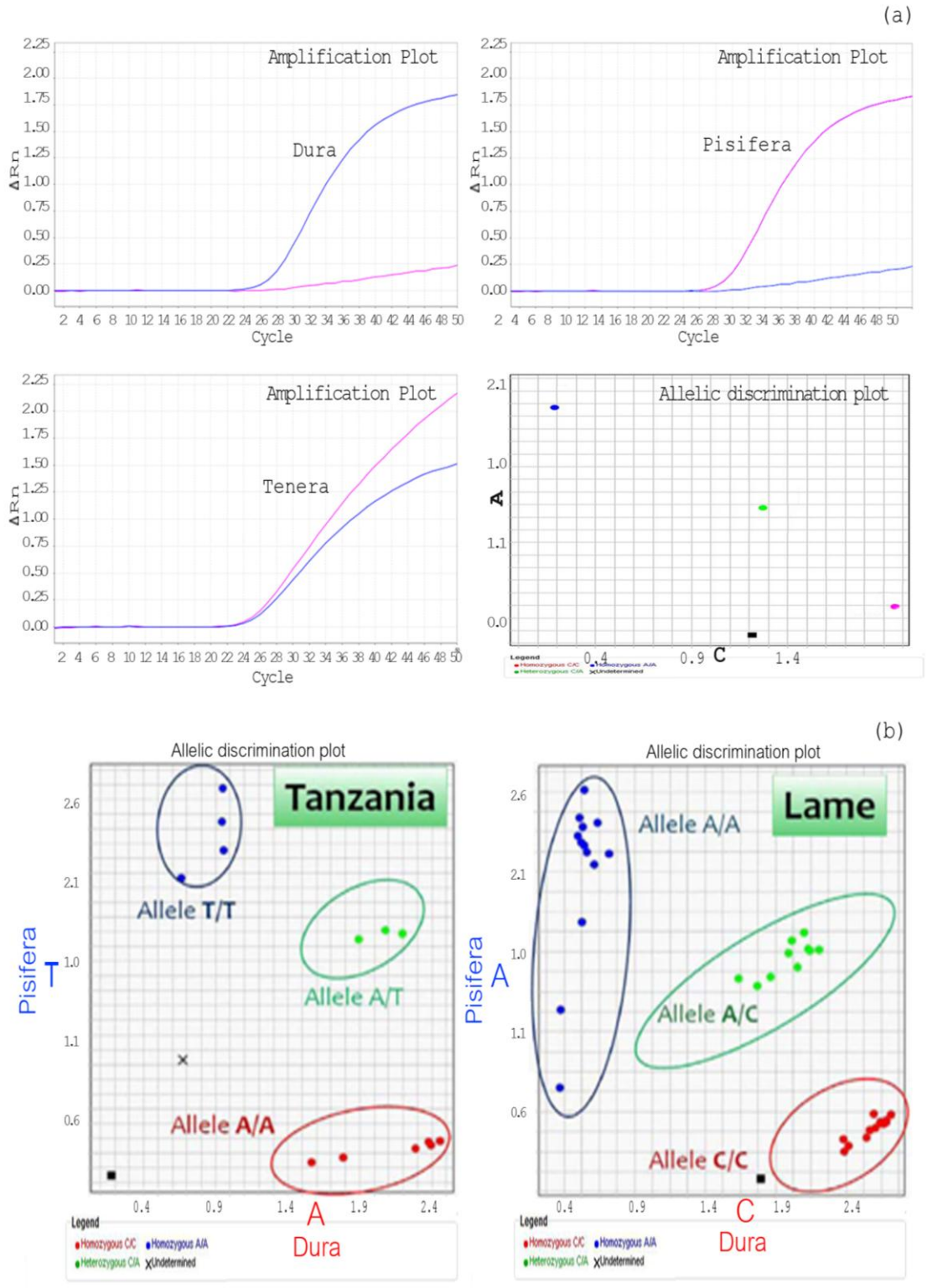


Figure 6 (a) The result of shell type detection on AVROS samples (dura, pisifera and tenera) by primer and probe designed from SNP_{LaAv} nucleotide sequence.The amplification and allelic discrimination plot were generated by real time PCR. (b) The discrimination plots generated by real time PCR showed oil palm shell type detection of Tanzania and La Me samples.

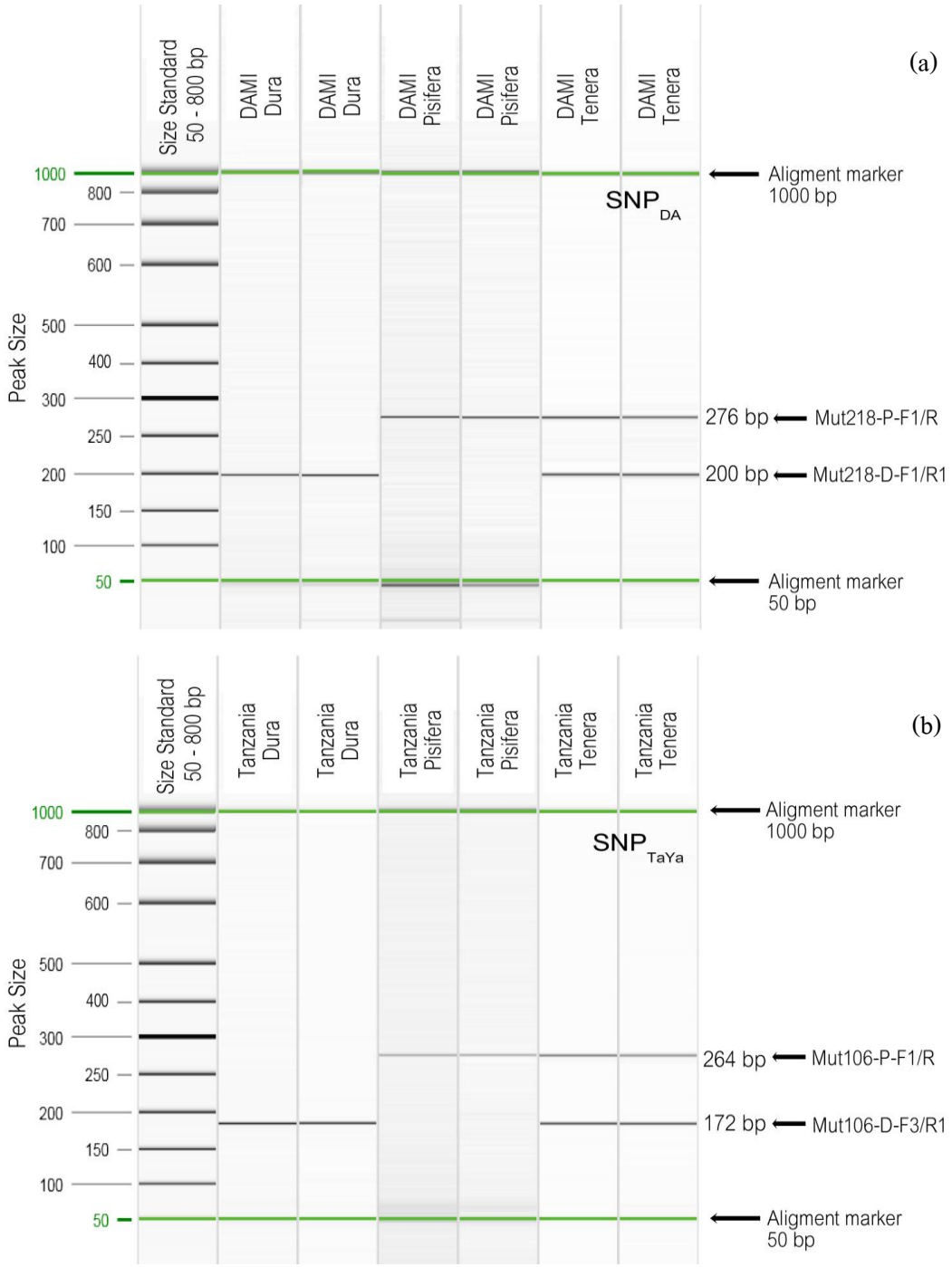


Figure 7 The detection of oil palm shell types by allelic specific primers. (a) The primer Mut218-D-F1/R1 gave the positive amplification (200 bp) in DAMI dura and DAMI tenera, while primer Mut218-P-F1/R gave the positive amplification (276 bp) in DAMI pisifera and DAMI tenera. (b) The primer Mut106-D-F3/R1 gave the positive amplification (172 bp) in Tanzania dura and Tanzania tenera, while primer Mut106-P-F1/R gave the positive amplification (264 bp) in Tanzania pisifera and Tanzania tenera.

สารชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกแอซิด

Bioactive Ingredients from Lactic Acid Bacteria

พัชรี ลิมปิษเฐียร[1/] ศุภมาศ กลิ่นขจร[1/] สุปรียา ศุขเกษม[1/] พัจนา สุภาสูรย์[2/]

Patcharee Limpisathian[1/] Supamas Klinkajorn[1/] Supreeya Sukkasem[1/] Patchana Supasoon[2/]

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in fermented products such as yogurt and proteolytic enzyme for industry used. The main roles of LAB are the production of lactic acid and proteolysis of the substrate to release peptides and free amino acids. In this study, peptide of nisin composed of 34 amino acids and ϒ-amino butyric acid (GABA) derived from free amino acid were investigated. Nisin as a biopreservative peptide produced by cleavage of leader peptides by specific peptidase from *Lactococcus* spicies. It inhibits biosynthesis of DNA, RNA, protein and polysaccharides in food poisoning bacteria and recognizes as safe. In addition, GABA produces from the substrate of glutamic acid by glutamic acid decarboxylase (GAD) enzyme. It inhibits neurotransmitter at nerve receptor site to reduce blood pressure, sleeplessness and depression symptom. The objectives of this study were to produce nisin using soy milk as medium and use it as biopreservative in pasteurized soy milk and tofu. The investigation included the optimal condition for GABA synthesizing from glutamic acid as substrate by LAB and applied to use in food products. The research was conducted at Post-harvest and Processing Research and Development Office, Department of Agriculture during October 2011 - September 2013.

In this study, *Lactococcus lactis* 1520 (*Lc. 1520*)alone or together with *Lactobacillus delbrueckii* 892 (*Lb*. 892)were inoculated in sterilized soy milk growth medium fermented under nitrogen. Temperature was control at 30ºCandstirred at 80 rpm. Clear zone method was using for nisin detection. The results showed that acidity was produced mostly by *Lactobacillus sp.* during pH 6.4 to 3.8. It was dropped to 4.0 within 10 hours. As the result, the production of nisin was in 24 hours and there were nonsignificant difference comparing to 48 hours. To comparison, nisin produced by *Lc.* 1520plus *Lb.* 892was higher than *Lc.* 1520 alone in 24 hours. There were significant difference ($p<0.01$). Moreover, to study the optimal condition for synthesizing GABA, the three LAB; *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 (*Lb*. 8014), *Lactobacillusbrevis* NCIMB 947

[1] สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Post-Harvest and Products Processing Research and Development Office

[2] สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

Plant Standard and Certification Office

and *Lactococcus lactis* NCIMB 701007, were examined. The results showed that LAB which had the highest ability to synthesis GABA was *Lb.* 8014. It could synthesize GABA as 162.1 mg/100g when the MSG had change from 0% to 0.1%. After that the application GABA fermentation was performed in Chinese cabbage fermented to produce a product with high GABA as the sandwich spread. Furthermore, the GABA synthesization by LAB was applied in mushroom because it contained high amount of glutamic acid which was the precursor of GABA. The results showed that although mushrooms consisted high content of glutamic acid but LAB could not use it as the precursors in the synthesis of GABA. When GABA was determined in fermented mushroom, it showed small amount in the product. This could estimate that LAB could not utilize glutamic acid occurring in the mushroom. On the whole, soy milk has potential to use as an alternative medium for nisin production and it has strong possible to use as the biopreservative for soy products such as pasteurized soy milk and tofu.In addition,GABA was used for products with high GABA as the sandwich spread. Consuming 100 grams of Chinese cabbage sandwich spread contained GABA 93.2 mg and also gained 213.18 kcal of energy.

Key-words : bacteriocin, nisin, soy milk, lactic acid bacteria, GABA, γ-Aminobutyric acid, ermentation

บทคัดย่อ

แบคทีเรียแลคติกแอซิดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตสารชีวภาพเพื่อเติมในผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ สารชีวภาพที่เกิดจากการหมักแบคทีเรียแลคติกแอซิดสองชนิด ได้แก่ ไนซิน (Nisin) เป็นสารกันบูดชีวภาพ (Biopreservative) ได้จากการหมักเชื้อแลคโตคอคคัส และกาบ้า (GABA) เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้งได้จากการหมักเชื้อแลคโตบาซิลลัส งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียแลคติกแอซิดเพื่อให้ได้เทคโนโลยีการสังเคราะห์ไนซินในถังหมักโดยใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตคอคคัสแลคทิส 1520 (*Lc.* 1520) และเทคโนโลยีการสังเคราะห์กาบ้าจากกรดกลูตามิคด้วยเชื้อแลคโตบาซิลลัสแพลนทาลัม 8014(*Lb.* 8014), แลคโตบาซิลลัสบรีวิส 947(*Lb.* 947) และแลคโตคอคคัสแลคทิส 701007 *(Lc.* 701007) รวมทั้งการใช้ประโยชน์จากสารชีวภาพกับผลิตภัณฑ์อาหาร ดำเนินการวิจัย ณ สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ปีงบประมาณ 2554 – 2556 การทดลองหมักไนซินจากนมถั่วเหลืองในถังหมักที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ºC ภายใต้แก๊สไนโตรเจน อัตราการคนที่ 80 รอบต่อนาที และควบคุมความเป็นกรดระหว่าง 6.4 - 3.8 ด้วยการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับการหมักเชื้อแลคโตบาซิลลัส 892 (*Lb.* 892) พบว่าการหมักด้วย *Lc.*1520 ควบคู่กับ *Lb.*892 ช่วยเร่งอัตราความเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 ชั่วโมง และมีผลต่ออัตราการผลิตไนซินของเชื้อ *Lc.*1520 ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.*1520 ร่วมกับ *Lb.*892 มี

ปริมาณมากกว่าไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.*1520 อย่างเดียวในเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับการหมักกาบ้า พบว่า *Lb.* 8014 มีความสามารถในการสังเคราะห์กาบ้าสูงที่สุดถึง 162.1 มก. ต่อ 100 ก. เมื่อปริมาณ MSG เปลี่ยนแปลงจาก 0% เป็น 0.1% การประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์กาบ้าด้วย *Lb.* 8014 ในการผลิตแหนมเห็ดนางฟ้า พบว่าถึงแม้เห็ดนางฟ้าจะมีปริมาณกลูตามิคสูงซึ่งแบคทีเรียแลคติกแอซิดจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กาบ้าแต่เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกาบ้าในแหนมเห็ดพบว่ามีปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกแอซิดไม่สามารถใช้กรดกลูตามิคในเห็ดนางฟ้าได้ ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัยนี้คือการประยุกต์ใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไนซินมีความเป็นไปได้สูงและสามารถใช้ประโยชน์จากไนซินในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองได้แก่นมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์และเต้าหู้แผ่นได้ และการประยุกต์ใช้ *Lb.* 8014 ในการเพิ่มกาบ้าในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีกาบ้าสูงซึ่งคือ แซนวิชสเปรดผักกาดขาว โดยการบริโภคแซนวิชสเปรดผักกาดขาว 100 ก. จะได้รับกาบ้า 93.2 มก. และได้รับพลังงาน 213.8 กิโลแคลอรี

คำหลัก: แบคทีริโอซิน ไนซิน นมถั่วเหลือง แบคทีเรียแลคติกแอซิด กาบ้า
แกมมา-อะมิโนบิวไทริคแอซิด การหมัก

คำนำ

แบคทีเรียแลคติกแอซิดถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกช่วยในระบบทางเดินอาหารในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ใช้ในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารและยาโดยเอนไซม์จากแบคทีเรียแลคติกแอซิดย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทม์สั้นๆ ได้แก่ เปปไทม์ลดความดันโลหิตและควบคุมความสมดุลย์ของเกลือแร่(SequenceNWGPLY)ซึ่งเกิดจากการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองและเปปไทม์ลดคลอเรสเตอรอล (Sequence LPYPR) จากการย่อยโปรตีนไกลซินิน (Korhonen and Pihlanto, 2003) แบคทีเรียแลคติกแอซิดยังถูกใช้ในการผลิตสารชีวภาพเพื่อเติมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ สารชีวภาพที่เกิดจากการหมักแบคทีเรียแลคติกแอซิด (LAB) สองชนิด ได้แก่ไนซิน (Nisin) เป็นสารกันบูดชีวภาพ (Biopreservative) ได้จากการหมักเชื้อแลคโตคอคคัส (*Lactococcus* sp.)และกาบ้า (GABA)เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง(Inhibitory neurotransmitter) ได้จากการหมักเชื้อแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus* sp.) ไนซินทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ตลอดจนเชื้อแลคติกแอซิดที่ทำให้อาหารบูดเปรี้ยวส่วนกาบ้าทำหน้าที่ในการยับยั้งความกังวลและความเครียดโดยเข้าไปจับกับบริเวณส่วนรับสัญญาณประสาทมีผลต่อการลดความดันโลหิตเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และบรรเทาอาการนอนไม่หลับ ซึมเศร้าและระบบประสาทอัตโนมัติผิดปกติ

การใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการผลิตอาหารเพื่อความปลอดภัยและสุขภาพของผู้บริโภคจึงนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่งเป็นการลดอัตราความเสี่ยงโรคมะเร็งจากการใช้สารเคมีในผลิตภัณฑ์

อาหารไนซินจากแบคทีเรียชนิดแลคโตคอคคัสเป็นสารโพลีเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ชนิด มีขนาด 3500 DA สามารถย่อยได้ในระบบย่อยอาหารของคนปกติใช้ควบคุมแบคทีเรียโดยมีผลต่อผนังเซลล์(Cell membrane) และ RNA ของเชื้ออาหารเป็นพิษได้แก่ *Listeria* (*L.*) *monocytogene Staphylococcus aureus Bacillus (B.) cereus* และ*Clostridium botulinum* ไนซินได้รับการรับรองความปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้เป็นสารเจือปนในอาหารในปริมาณสูงถึง 10,000 IU/g (FDA, 1988) และมีแนวโน้มการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในต่างประเทศ เช่น ประเทศอังกฤษใช้ไนซิน 2.5 - 5 มก. /ลิตร ในการยืดอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการพลาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 64.4ºC นาน 2.5 นาที ซึ่งไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสปอร์และแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์อนุญาตให้ใช้ไนซินปริมาณไม่เกิน 10 มก./กก. ในผลิตภัณฑ์ประเภทครีม (Flavoured, Whipped, Thickened sour cream) และใช้ในผลิตภัณฑ์แป้งแผ่น (Hot plate flour) ในปริมาณ 3.75 มก./กก. เพื่อยับยั้งเชื้อ *B. cereus*ซึ่งไม่ถูกทำลายระหว่างกระบวนการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังอนุญาตให้ใช้ในปริมาณที่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ ที่มีค่าความเป็นกรดที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ไข่เหลว ผลิตภัณฑ์ขนมจากนมและไขมัน ซอส มายองเนส น้ำสลัด ซึ่งต้องควบคุมค่าความเป็นกรดที่ 4.2 เพื่อเพิ่มรสชาติแต่อาจเสื่อมเสียได้จากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจึงเติมไนซินในปริมาณ 2.5 - 5 มก./ล. และอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อและสัตว์ปีกในปี 2007 ในปริมาณ 6.9 และ 5.5 มก./กก. ตามลำดับ FSANZ (Food Standards Australian and New Zealand andCodex Standards) อนุญาตให้ใช้ไนซินในเนื้อและสัตว์ปีกปริมาณ12.5 มก./กก. และ ระดับ GMP กับผลิตภัณฑ์นม ไข่ และ น้ำผักผลไม้ จึงเห็นได้ว่าในต่างประเทศมีการใช้ไนซินอย่างกว้างขวาง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เทคโนโลยีการผลิตไนซินในถังหมักและการใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์อาหาร ดำเนินการศึกษาถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและการใช้ประโยชน์จากไนซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกแอซิด เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย โดยทดสอบกับนมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนการผลิต เป็นเทคโนโลยีใหม่

สำหรับงานวิจัยในการสังเคราะห์ γ-Aminobutyric acid(GABA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (Inhibitory neurotrasmittert) มีหน้าที่เข้าไปจับกับบริเวณส่วนรับสัญญาณประสาท (Nerve receptor site) ที่ก่อให้เกิดความกังวลและความเครียด ในร่างกายมนุษย์ปกติจะพบ GABA ประมาณ 30-40% ในเซลล์ประสาททั้งหมดในสมอง (Figure 1)

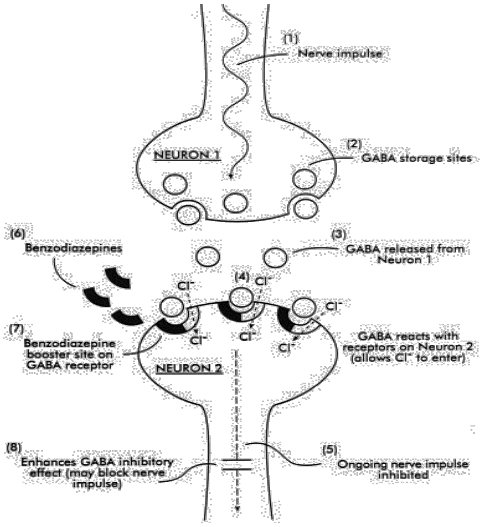


Figure 1 γ-Aminobutyric acid(GABA) as theinhibitory neurotrasmittert

www.benzo.org.uk/manual/bzcha01.htm (Ashton, 2011)

GABA สามารถสังเคราะห์ในพืชและจุลินทรีย์โดยกระบวนการทางชีวภาพผ่านปฏิกิริยา (Decarboxylation) ของกรดกลูตามิคและเกลือของกรดกลูตามิคโดยเอนไซม์ GAD ดังนี้

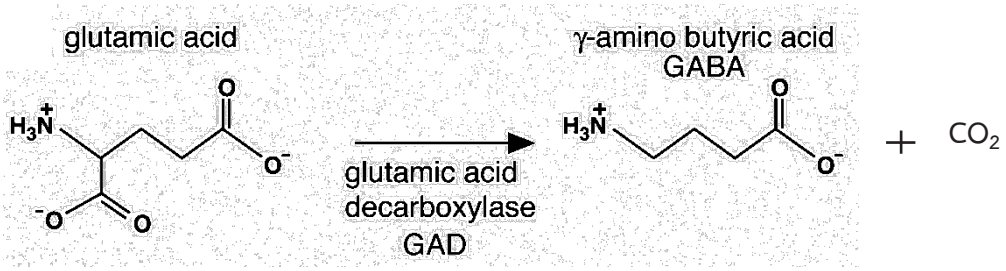


Figure 2 Glutamic acid as the precursor of GABA produces by enzyme GAD

From: Food Processing and Preservation Technology III(JAICA andHiroshima Prefectural Food Research Center, 2007)

GABA เป็นสารที่มีผลงานวิจัยทางการแพทย์ระบุไว้ว่าเป็นสารช่วยในการบำบัดอาการต่างๆ โดยมีหน้าที่สำคัญคือลดความดันโลหิตแบบซิสโตลิค (Vemulapalli andBarletta, 1984) เพิ่มความสามารถในการเรียนรู้เพื่อแยกแยะความแตกต่าง (Ishikawa andSaito, 1984) และบรรเทาอาการต่างๆที่เกิดขึ้นในวัยทองเช่นนอนไม่หลับ ซึมเศร้า และระบบประสาทอัตโนมัติผิดปกติ (Okada *et al*., 2000) เนื่องจากวิถีชีวิตและการบริโภคอาหารของคนไทยที่เปลี่ยนแปลงไป ประกอบกับความเครียดทำให้อัตราการป่วยและตายจากโรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มขึ้น โดยข้อมูลจากสำนักโรคไม่ติดต่อ กระทรวงสาธารณสุข ปี 2550 พบคนไทยมีอัตราตายต่อประชากร 1 แสนคน โดย

ป่วยเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด 55 คน โรคความดันโลหิตสูง 3.6 คน ซึ่งโรคเหล่านี้สามารถป้องกันได้ด้วยการลดพฤติกรรมเสี่ยงทั้งการสูบบุหรี่ การดื่มสุรา สารเสพติด ความเครียดและการขาดการออกกำลังกาย (สำนักนิเทศ, 2552) และอีกหนึ่งทางเลือกสำหรับการป้องกันโรคเหล่านี้คือการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่างๆ (Nutraceutical food) โดยอาหารที่ได้รับความนิยมในกลุ่มนี้คืออาหารที่มี GABA หรือ γ-Aminobutyric acid เป็นองค์ประกอบซึ่งควรบริโภค GABA 250-500 มก./ครั้ง 3 ครั้งต่อวัน และเพื่อบำบัดอาการนอนไม่หลับต้องบริโภค GABA ปริมาณ 750 มก. ก่อนนอนจึงมีการผลิตอาหารที่มี GABA เป็นองค์ประกอบตัวอย่างเช่น ชาเขียวที่มี GABA สูง (Garbaron Tea) โดยการหมักชาในภาวะไม่มีอากาศการเพิ่มปริมาณ GABA ในจมูกข้าว โดยการแช่น้ำงานวิจัยที่เกี่ยวกับ GABA ส่วนใหญ่จะเป็นการทำให้เกิด GABA จากการงอกของข้าวหรือ ธัญพืชต่างๆ โดยอาศัยสารตั้งต้นคือกรดกลูตามิคในการเกิดปฏิกิริยา (Carboxylation)จากวัตถุดิบตั้งต้น เช่น การศึกษาผลของกระบวนการแช่และกระบวนการงอกของข้าวกล้อง (หอมมะลิ 105) นอกจากนี้การใช้เชื้อจุลินทรีย์ LAB บางชนิดสามารถสร้าง GABA ได้โดย LAB เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase) ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตเกลือแลคติกเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลลิซึม (Metabolism) ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus* และ *Leuconostos*(Wood and Holzapfel, 1997)

อุปกรณ์และวิธีการ

การสร้างไนซิน

อุปกรณ์

1. ถังหมักแบบควบคุมอุณหภูมิ
2. เครื่องสกัดนมถั่วเหลือง
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
4. เชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
5. สารมาตรฐานไนซิน จากบริษัท B&K Technology Group
6. วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ถั่วเหลืองและเต้าหู้แผ่น

วิธีการ

1. การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1) อาหาร MRS 2) นมถั่วเหลืองเติมเชื้อ *Lc.*1520 3) นมถั่วเหลืองเติมเชื้อ *Lc.*1520 และ *Lb.*892และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของนมถั่วเหลืองที่ใช้หมัก การเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ในอาหาร MRS ด้วยการขยายจากเชื้อที่เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ –80°C นำมาเลี้ยงเชื้อตั้งต้นในอาหารเหลว MRS 2 ครั้งที่อุณหภูมิ 37ºC 24 ชั่วโมง แล้วเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 4000 รอบ/นาที ให้ได้น้ำหนักเซลล์ คิดเป็น 0.4%เติมในอาหารเหลว MRS เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมงวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์โดยวิธีสเปรดเพลท (Spread plate) สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ในนมถั่วเหลืองปริมาตร 1 ลิตร ใช้เชื้อ 0.4% ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 บริกซ์ (Brix) ในถังหมักที่ควบคุมอุณหภูมิ 30ºC การเป็นสุญญากาศด้วยไนโตรเจนและอัตราการคนด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที จึงบันทึกความเป็นกรดในช่วง pH 6.0 - 4.0 เก็บตัวอย่างที่ 24 48 และ 72ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปฏิกิริยาของไนซินด้วยวิธีเคลียร์โซนส่วนการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ในนมถั่วเหลืองแบบควบคุมความเป็นกรดด้วยเชื้อ *Lb.* 892 ร่วมกับการหมักเชื้อ *Lc.*1520 โดยการเติมเชื้อทั้งสองร่วมกันในนมถั่วเหลืองภายใต้ไนโตรเจนเพื่อควบคุมการหมักให้มีสภาวะเช่นเดียวกันกับข้างต้นและสภาวะความเป็นกรดในช่วง pH 6.4- 3.8 (Figure 3)

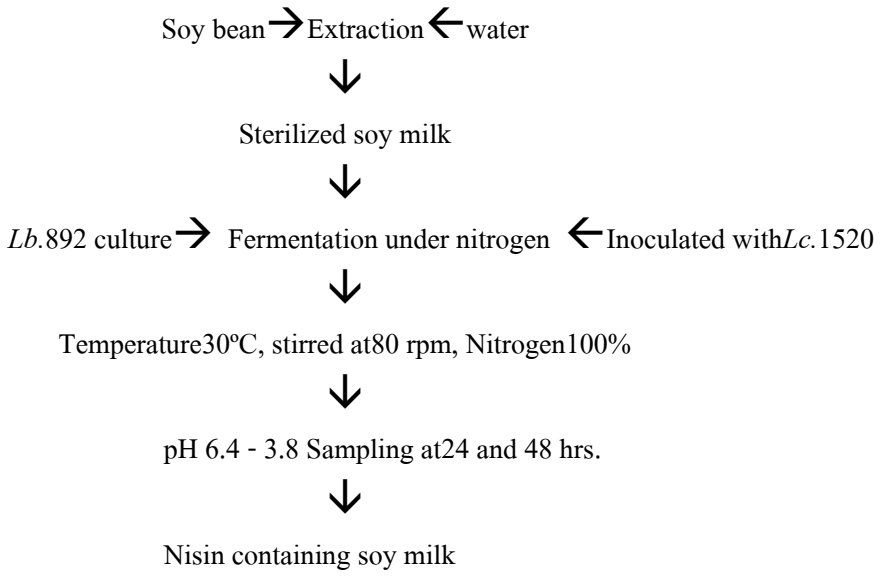


Figure 3 Nisin fermentation in soy milk inoculated with*Lc. lactis* 1520and *Lb.delbrueckii*892

2. การทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดสอบเติมไนซินในผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่นและนมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์

เตรียมเต้าหู้แผ่นโดยใช้ถั่วเหลือง 1 กก. ต่อน้ำ 4 ล. แมกนีเซียมซัลเฟต 2 ช้อนโต๊ะ ล้างน้ำแล้วแช่น้ำจนเมล็ดถั่วพองและอมน้ำเต็มที่ เอาเปลือกออกให้หมดจึงปั่นจนละเอียด กรองส่วนผสมด้วยผ้าขาวบาง

บีบเอานมถั่วเหลืองออกให้หมด นำนมถั่วเหลืองมาต้มเดือดจนกระทั่งอุณหภูมิ 70 – 80 ºC จากนั้นแบ่งนมถั่วเหลืองออกเป็น 4 ส่วนๆ ละ 1 ล. เติมไนซิน 0 30 150 และ 750 ppm หรือ 0 0.6 1.5 และ 7.5 ก. ตามลำดับ คนให้ละลายเติมแมกนีเซียมซัลเฟตส่วนละครึ่งช้อนโต๊ะลงในนมถั่วเหลืองแต่ละส่วนคนให้เข้ากันโดยค่อย ๆ เติมทีละน้อยจนข้นและโปรตีนถั่วเหลืองจับตัวเป็นก้อน ตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้โปรตีนตกตะกอนทับด้วยของหนักๆ ประมาณ 3 - 4 ชั่วโมง จะได้เต้าหู้แข็ง บรรจุใส่ถุงปิดปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 10 ºC เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ Enterobacteriaceae โดยวิธี ISO 21528-2:2004 และแบคทีเรียแลคติกแอซิดโดยวิธี ISO 15214: 1998 นอกจากนี้ได้ดำเนินการทดสอบเติมไนซินในนมถั่วเหลืองซึ่งเตรียมโดยใช้อัตราส่วน 1: 4 (ถั่วเหลือง: น้ำ) ที่ผ่านการต้มเดือดและเติมไนซินปริมาณ 0 10 20 และ 30 ppm เก็บรักษาในตู้เย็น 10 ºC นาน 3 สัปดาห์

การเติมเชื้อ *Lc.*1520 ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง

เตรียมนมถั่วเหลืองด้วยการชั่งถั่วเหลืองแห้ง 160 ก. แช่น้ำทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืนให้เมล็ดพองเต็มที่ ประมาณ 16 ชั่วโมง เติมน้ำสะอาด 1,300 มล. ต้มจนอุณหภูมิถึง 83 ºC จึงปั่นถั่วเหลืองให้ละเอียดแล้วกรองผ่านตะแกรงแยกกากออกแล้วปรับความหวานด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 บริกซ์ เติมนมถั่วเหลืองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ล. ในถังหมักที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หมักนมถั่วเหลืองโดยเติมเชื้อ *Lc.*1520 และเชื้อ *Lb.*892 พร้อมกันในถังหมักในปริมาณอย่างละ0.4% หรือ 4 ก. ต่อนมถั่วเหลือง 1 ล. ควบคุมการเป็นสุญญากาศด้วยไนโตรเจน คนด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาทีอุณหภูมิ 30 ºC บันทึก อุณหภูมิ pH และเก็บตัวอย่างนมถั่วเหลืองจากถังหมักที่เวลา24 และ 72ชั่วโมง นำไปกรองผ่านเมมเบรน ขนาด 0.2 ไมครอน จึงทดสอบเคลียร์โซน

การสังเคราะห์กาบ้า

อุปกรณ์

1. Lactic acid bacteria สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus brevis* NCIMB 947 และ *Lactococcus lactis* NCIMB 701007
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Blood Sheep agar
4. ผักกาดขาว

วิธีการ

1.ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA เบื้องต้น

ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB ทำการเลี้ยงเชื้อ LABทั้ง 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท (Monosodium glutamate; MSG) 0.1% และใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1.0% ทำการหมักภายใต้สภาวะ

ไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัด GABA ที่ผลิตได้โดยวิธี GABAase test (Spectrophotometric method) เพื่อดูความสามารถในการผลิต GABA ของ LAB

2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Glutamic acid decarboxylase; GAD) ในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ของ LABที่สามารถสังเคราะห์ GABA ได้สูงสุดโดยใช้วิธีการ Pickle pickling test รวมทั้งทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสังเคราะห์ GABA โดยจุลินทรีย์ LABโดยปัจจัยที่ทำการศึกษาได้แก่ ปริมาณกรดกลูตามิค และปริมาณเกลือ ในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมโดยแปรระดับสภาวะปริมาณกรดกลูตามิค: 0%,0.25% และ 0.50% โดยน้ำหนักปริมาณเกลือ: 0%, 0.5% และ 1.0% โดยน้ำหนักและติดตามการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาการหมักโดยการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ LAB ที่มีชีวิต

3. คัดเลือก LABที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA

ทำการคัดเลือก LABที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA จาก 3 สายพันธุ์คือ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ด้วยวิธีการ Pickle pickling test โดยใช้ปริมาณเกลือ และ MSG ที่ได้จากข้อ 2

4. ประยุกต์ใช้สภาวะของการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี GABA สูง

ประยุกต์ใช้สภาวะของการหมักที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มปริมาณ GABA ในผลิตภัณฑ์ รวมทั้งทำการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ได้แก่ สี ความข้น รสชาติ รวมทั้งกลิ่นรสต่างๆ ของผลิตภัณฑ์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่น รสชาติ และลักษณะปรากฏที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยใช้วิธีการวิเคราะห์เชิงพรรณนา (Descriptive Analysis) จากนั้นศึกษาคุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สี (L a b) ค่าความเป็นกรดด่างปริมาณ GABA และปริมาณกรดกลูตามิค

5. วิเคราะห์คุณค่าโภชนาการของผลิตภัณฑ์

วิเคราะห์คุณค่าโภชนาการของผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคได้แก่พลังงาน พลังงานจากไขมัน ไขมันทั้งหมด โซเดียม คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ใยอาหาร น้ำตาล โปรตีน วิตามิน B1 วิตามิน B2 แคลเซียม เหล็ก และ GABA

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างไนซิน

1. การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่สามารถผลิตไนซินได้แก่เชื้อ*Lc.*1401, *Lc.*1520, *Lb.*1034และ *Lb.*938จากการวิเคราะห์การเจริญเติบโต (Exponential phase) และนับจำนวนโคโลนีทุก 24 48 และ 72 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่า *Lc.*1401*Lb.*1034 และ *Lb.*938 การเจริญเติบโตอยู่ในช่วงระหว่าง 24 ชั่วโมง (Exponential phase) มีปริมาณจำนวนเซลล์เป็น $1.14x10^8$

1.38x10^{9} 1.45x10^{8}cfu/ml ตามลำดับ ยกเว้น *Lc.*1520 การเจริญเติบโตสูงสุด (Exponential phase) อยู่ในช่วงระหว่าง 48ชั่วโมง มีปริมาณจำนวนเซลล์เป็น 1.43x10^{10}cfu/ml เชื้อ *Lc.*1520 จึงมีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุดยาวนานกว่า*Lc.*1401*Lb.*1034 และ*Lb.*938 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบการสร้างไนซินของเชื้อแลคโตคอคคัสได้แก่ สายพันธุ์ ATCC11454, 354/07; University of Minnesota, 7960; University of Oregon, DL16; University of Utah, 150; University of Minnesota, และ 148; University ofMinnesota ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE (Yang and Ray, 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบแบคทีริโอซินในสายพันธุ์ *Lb. curvatus*ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Lb.*938 ในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าการสร้างแบคทีริโอซินอาจแตกต่างชนิดกันคือเป็นแบคทีริโอซินชนิดแลคติซิน (Lacticin) ซึ่งมีผลยับยั้ง *L. monocytogenes*(อรอนงค์, 2550)

การทดสอบการวิเคราะห์ปฏิกิริยาของแบคทีริโอซินด้วยเทคนิคการใช้เคลียร์โซนซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับการสร้างไนซิน ด้วยการยับยั้งเชื้อ *Lb.*449 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีไนซินการวิเคราะห์เคลียร์โซนโดยวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงกลมใสรอบๆ จุดที่หยดตัวอย่าง พบว่า ไนซินที่ 20 50 100 และ 500 ppm มีค่าเฉลี่ยเคลียร์โซนที่ 9.29 13.29 17.25 และ 24.12 มม. ตามลำดับ สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1401 *Lc.*1520 *Lb.*938 และ *Lb.*1034ในอาหาร MRS เพื่อทดสอบ เคลียร์โซนพบว่าเชื้อ *Lc.*1401 *Lb.*938 และ *Lb.*1034ไม่มีการสร้างเคลียร์โซนยกเว้น *Lc.*1520 พบเคลียร์โซนในตัวอย่างที่ไม่เจือจางเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง เป็น 12.4 11.3 และ 11.75 มม. ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบค่าปฏิกิริยาของไนซินที่เวลา 24 ชั่วโมง กับปริมาณไนซินมาตรฐานพบว่าอยู่ในช่วงประมาณ 46.7$\pm$3.5 ppm อย่างไรก็ดีช่วงเวลาที่มีค่าปฏิกิริยาของไนซินสูงสุดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างไนซินโดยเฉลี่ยอยู่ที่จุดกลางของช่วงระยะการเติบโต (Exponential phase) และยังขึ้นกับเชื้อที่ใช้ทดสอบเคลียร์โซน (Nisin sensitive strain) อีกด้วย(Nissen-Meyer, *et al*., 1992)

ผลการวิเคราะห์นมถั่วเหลืองที่ใช้หมักมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solid) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) เป็น 15.88 0.83 0.53 15 และ 17% ตามลำดับ ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ ความชื้น สารเยื่อใย เถ้า แคลอรีจากไขมัน และแคลอรีทั้งหมดเป็น 82.64 0.17 0.12 4.77 และ 71.61%ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Nutritive value in soy milk as mediumfor nisin production

Nutritive value	Percent
Carbohydrate	15.88
Protein	0.83
Fat	0.53
Moisture	82.64
Fiber	0.17
Soluble solid	15
Total solid	17
Ash	0.12
Calories from fat	4.77
Total calories	71.61

ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตส่งผลต่อการสร้างไนซินเนื่องด้วยเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดใช้คาร์โบไฮเดรตในการเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก (Lactic acid) ในช่วงระยะการเจริญเติบโต (Logarithmic growth) และเริ่มกระบวนการสร้างไนซินต่อไป (Klaenhammer, 1993) เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แล้ว ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในสูตรนมถั่วเหลืองที่ใช้มีปริมาณสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

การเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ในอาหาร MRS

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดประกอบด้วยเปปโทน บีฟเอกแทรก ยีสต์เอกแทรก กลูโคส และทวีน 80 (Peptone, Beef extract, Yeast extract, Glucose, Tween 80) เป็นส่วนใหญ่คิดเป็นส่วนของคาร์โบไฮเดรต 2%และส่วนของโปรตีน 0.564% ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต จากผลการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $1.47x10^{9}$ $1.43x10^{10}$และ $1.46x10^{9}$ cfu/ml จำนวนเซลล์สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงที่ 72 ชั่วโมง Nettles and Barefoot (1993) รายงานการสร้างไนซินในช่วงของ Logarithmic growth ซึ่งเกิดการสังเคราะห์เปปไทม์ (รวมทั้งเกิดการ Transcription และ Translation ของโปรไนซิน ซึ่งประกอบด้วย Serine Cysteine และ Threonine) จากนั้นจึงส่งไปยังผนังเซลล์ในช่วงของการเจริญเติบโต (Exponentialgrowth) และสอดคล้องกับรายงานของ Yang and Ray (1994) ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มีผลต่อการสร้างไนซินรวมทั้งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อก็ส่งผลต่อค่าความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การสร้างไนซินยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีกได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ (Strain) และเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

การเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ในนมถั่วเหลืองและการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 แบบควบคุมความเป็นกรดด้วยเชื้อ *Lb.*892 ในนมถั่วเหลือง

การเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.*892 ในถังหมักนมถั่วเหลือง ภายใต้ไนโตรเจน ควบคุมอัตราการคนที่ 80 รอบ/นาที อุณหภูมิที่ 30 ºC และความเป็นกรดในช่วง 6.4 - 3.8 โดยเก็บตัวอย่างทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างจากถังหมักที่มีการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 เพียงอย่างเดียวในนมถั่วเหลืองปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และมีแนวโน้มลดลงในช่วง 72 ชั่วโมง เป็น $1.47x10^{9}$ $1.43x10^{10}$และ $1.46x10^{9}$ cfu/ml ตามลำดับ ไม่พบปริมาณเคลียร์โซนในช่วง 24 ชั่วโมง แต่พบในช่วง 48 ชั่วโมงโดยมีค่าเฉลี่ยของเคลียร์โซนอยู่ที่ 11.7 มม. หากแต่การเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520ร่วมกับเชื้อ *Lb.*892 ในเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นวัดจากค่าเคลียร์โซน 13.19 มม. และพบปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นในเวลา 48 ชั่วโมง ในถังหมักที่เลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520ร่วมกับเชื้อ *Lb.*892 โดยมีค่าเคลียร์โซน 16.5 มม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของเคลียร์โซนระหว่างการเลี้ยงเชื้อร่วมกันที่ 24 และ 48 ชั่วโมง (Figure 5) และแตกต่างกับการเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ 48 ชั่วโมง ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง *Lc.*1520 อย่างเดียวความเป็นกรดไม่ลดลง (Figure 4) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ร่วมกับ *Lb.*892 ลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 4 ในช่วง 10 ชั่วโมง และลดลงเป็น 3.8 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลวิเคราะห์ทางสถิติของเคลียร์โซนพบว่าการหมักเชื้อ Lc.1520 ควบคู่กับ *Lb.*892 ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ปริมาณไนซินไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) นั่นหมายความว่าสามารถเก็บเกี่ยวไนซินได้ในเวลา 24 ชั่วโมง (Table 2)

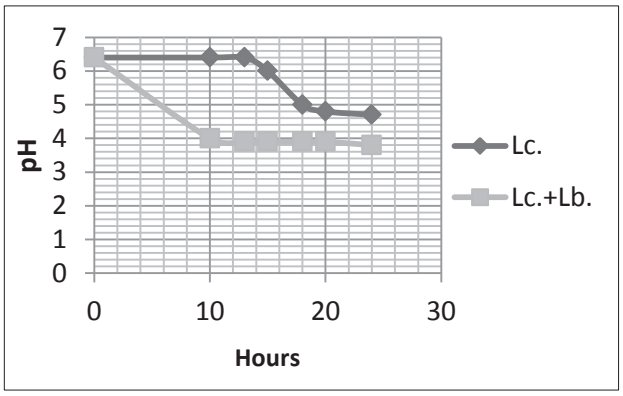


Figure 4 The pH of soy milk inoculated with*Lc.*1520 alone and *Lc.*1520 plus *Lb.*892

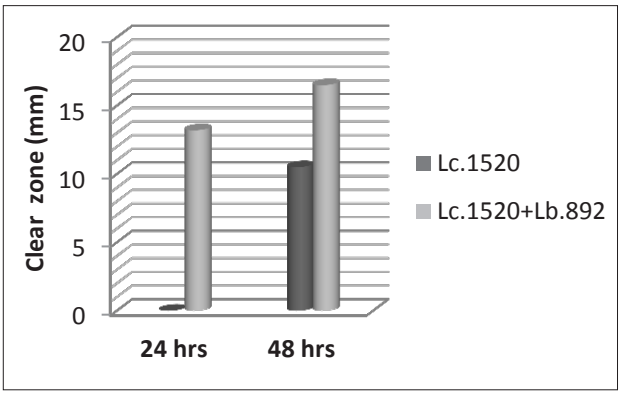


Figure 5 Nisin activity by clear zone inoculated with *Lc.*1520 alone and*Lc.*1520plus*Lb.*892 in soy milkmedium

Table 2 Analysis of variance of nisin activity inoculated with*Lc.*1520plus*Lb.*892in24 and48 hours

	Lc+Lb 24 hrs.	**Lc+Lb 48 hrs.**
Mean	13.19444	16.5
Variance	3.153093	4.119318
Observations	45	45
df	44	44
P(F<=f) one-tail	**0.189369**	

จากผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การหมักด้วย *Lc*.1520 ควบคู่กับ *Lb.*892 มีผลต่ออัตราการผลิตไนซินของเชื้อ *Lc*.1520 ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างไนซินซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yang and Ray (1994) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อแลคโตคอคคัส 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE (Tryticase glucose yeast extract broth) โดยสรุปว่าความเป็นกรดสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างไนซินที่แตกต่างกันและพบว่าไนซินมีค่าปฏิกิริยาสูงสุดที่ความเป็นกรด 6.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TGE buffer หากแต่ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองและอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

2. การทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดสอบเติมไนซินในผลิตภัณฑ์อาหาร

การทดสอบไนซินด้วยการเติมลงในนมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ที่ระดับ 0 10 20 และ 30 ppm อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ พบว่าปริมาณไนซินตั้งแต่ 10 20 และ 30 ppm มีผลต่อ แบคทีเรียแลคติกแอซิด และมีผลให้ปริมาณกรดแลคติกลดลงอย่างเห็นได้ชัดโดยปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงจาก $4.3x10^6$cfu/ml ที่ 0 ppm หรือไม่มีการเติมไนซินเลย เป็น $2.1x10^6$ $1.0x10^6$ $5.2x10^5$cfu/ml ตามลำดับ และปริมาณกรดแลคติกก็ลดลงเช่นกันจาก 0.19 ก./100 ก. ที่ 0 ppm เป็น 0.09 0.11 0.07 ก./100 ก. ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อปริมาณไนซินเพิ่มขึ้น 10 ppm ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงประมาณครึ่งหนึ่งและมีผลให้กรดแลคติกลดลงเช่นกันทำให้นมถั่วเหลืองมีรสเปรี้ยวน้อยลงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมถั่วเหลืองได้ (Table3)

นอกจากนี้ได้ทดสอบประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กับเต้าหู้แผ่น อายุการเก็บรักษา 7 วัน ปริมาณเชื้อ Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงมากกว่า 50% ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm และที่ความเข้มข้นของไนซินเพิ่มขึ้น 5 เท่าจาก 30 ppm เป็น 150 ppm และลดลงเหลือน้อยกว่า 10 cfu/ml เมื่อความเข้มข้นของไนซินเท่ากับ 750 ppm (Table 4) ดังนั้นไนซินจึงมีแนวโน้มในการใช้ยับยั้งการเสื่อมเสียเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกแอซิดได้ในผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น

Table 3 Lactic acid bacteria (LAB) andLactic acid in pasteurized soy milk storage

Storage3 weeks 10ºC Nisin (ppm)	LAB[1] cfu/ml	Lactic acid[2] g/100g
0	$4.3x10^6$	0.19
10	$2.1x10^6$	0.09
20	$1.0x10^6$	0.11
30	$5.2x10^5$	0.07

[1/]ISO: 5214: 1998

[2/] In house method based on Food Research International; HPLC analysis

Table 4 Enterobacteriaceae andlactic acid bacteria in soy bean cake after storage at 10ºC

Soy bean cake storage7 days 10ºC Nisin (ppm)	Enterobacteriaceae cfu/ml	LAB cfu/ml
0	$2.8x10^4$	$1.1x10^4$
30	$3.9x10^3$	$1.2x10^2$
150	$4.0x10^2$	$1.0x10^2$
750	$1.6x10^2$	<10 (None)

การทดสอบเติมเชื้อ *Lc.*1520 ในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีรายงานการวิจัยการใช้แบคทีเรียแลคติกแอซิดในการเติมลงในอาหารหมักเพื่อการใช้ประโยชน์ของแบคทีริโอซินควบคู่กับกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารชนิดนั้นๆบูดเสียรวมทั้งมีการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดหลายสายพันธุ์เพื่อให้สร้างแบคทีริโอซินที่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารบูดเสียได้หลายชนิด ได้แก่อาหารแช่เย็น ผักดอง เครื่องดื่ม ไส้กรอก เนื้อ ไข่ และเนยแข็ง เป็นต้น (Nettles, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ในการทดสอบการเติมเชื้อ *Lc.*1520 ลงในโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลือง ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงอายุการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่ำ 10°C (Chilling temperature) ในตู้เย็นคือมีปริมาณจาก $2.1x10^8$เป็น $2.0x10^8$cfu/ml และลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเก็บรักษาไว้ 3 สัปดาห์ พบปริมาณ $1.0x10^8$cfu/ml สำหรับนมถั่วเหลืองที่มีการเติมรสได้แก่ รสสละ รสสตรอเบอรี่ รสส้ม และรสแอปเปิ้ล ปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิด ที่เก็บรักษาที่ 0 วันเป็น $3.7x10^8$ $3.6x10^8$ $4.0x10^8$และ $3.2x10^8$cfu/ml ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาไว้ 2 สัปดาห์พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกแอซิดลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งเป็น $1.2x10^8$ $1.5x10^8$ $1.5x10^8$ และ $1.0x10^8$cfu/ml ตามลำดับ และลดลงใกล้เคียง 10^7 cfu/ml ที่อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ (Figure 6)

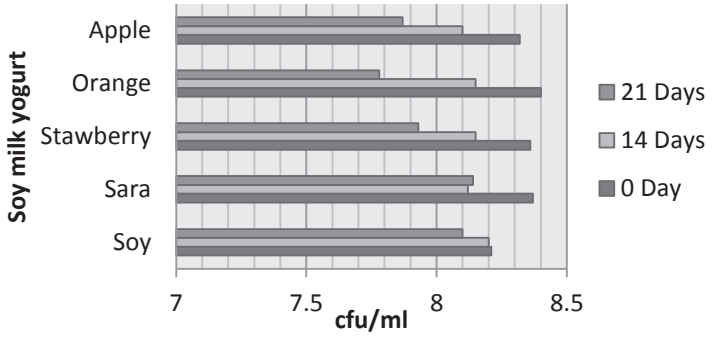


Figure 6 Lactic acid bacteria in soy milk yogurt inoculated with*Lc.*1520

จำนวนแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่ลดลงมีผลให้ปริมาณกรดลดต่ำลงด้วย การบูดเสียของผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองขึ้นกับอุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษาปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นจากการหมักเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่เป็นโปรไบโอติก (Probiotic) ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตมีรสเปรี้ยว และมีค่า pH ลดลง เป็นผลให้อายุการเก็บรักษาสั้นลง การเติมไนซินจึงช่วยลดความเป็นกรดและสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตไว้ได้โยเกิร์ตที่มีการเติม *Lc.*1520 จึงมีรสเปรี้ยวช้า สามารถยืดอายุการเก็บรักษา สอดคล้องกับรายงานการใช้เชื้อแลคโตคอคคัสแลคทิส (*Lc. lactis* DPC3147) ในการยืดอายุการเก็บรักษาโยเกิร์ตและชีส โดยใช้ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* Scott A และ *B. cereus* (Deegan, *et al*., 2006) อย่างไรก็ตามการบริโภคผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้น ผู้บริโภคมีวัตถุประสงค์ต้องการบริโภคจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยไนซินเช่นกัน ดังนั้นหากมีการเติมไนซินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผู้ผลิตจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นด้วย

การทดสอบค่าไนซินโดยวิธีเคลียร์โซนในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองพบว่ามีค่าเฉลี่ยเคลียร์โซนที่ 24 และ 72 ชั่วโมง ที่ 18.1และ 18.2 มม. ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Figure 7)

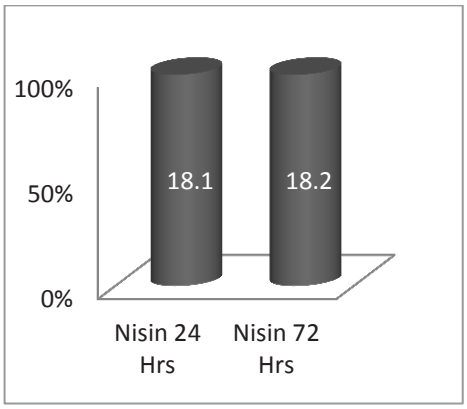


Figure 7 Nisin activity by clear zone in soy milk yogurt at 24 and72 hours

ดังนั้นปริมาณไนซินสามารถเกิดขึ้นได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากการหมัก คือ ในช่วงที่โยเกิร์ตสามารถรับประทานได้ โดยทั่วไปความเป็นกรดที่ใช้บ่มโยเกิร์ตนมอยู่ที่ 4.9 ในเวลา 5 - 6 ชั่วโมง ซึ่ง

ความเป็นกรดและเวลาที่ใกล้เคียงกับโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองกล่าวคือความเป็นกรดของนมถั่วเหลืองอยู่ที่ 4.8 ในเวลา 8 ชั่วโมง แต่ในการบ่มโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองนั้นปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ที่ 17% ทำให้โยเกิร์ตที่ได้มีลักษณะเป็นโยเกิร์ต นมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม (Table5)

Table 5 Sensory evaluation of soy milk yogurt by 34 panels.

Flavor	**Sweet**	**Color**	**Viscosity**	**Sour**	**Odor**	**Acceptance**	**Average**
Sara	6.33	6.65	5.62	6.14	6.43	6.43	6.27^{abc}
Soy	6.00	5.21	4.90	5.53	5.79	5.84	5.54^{ab}
Orange	5.95	6.44	4.79	5.39	5.21	5.47	5.54^{b}
Stawberry	5.63	6.53	5.42	5.42	5.84	5.47	5.72^{ab}
Apple	5.84	5.74	4.63	5.37	4.84	5.16	5.26^{ab}
Lychee	5.37	5.74	4.68	4.53	4.79	4.63	4.96^{ac}
Bitouy	5.21	5.63	4.95	4.47	4.63	4.58	4.91^{ab}
Vanilla	5.26	4.32	4.32	4.37	5.00	4.47	4.62^{c}
Std Dev.	**0.40**	**0.78**	**0.43**	**0.63**	**0.64**	**0.69**	

Mean with the same superscript letters are non-significant difference ($p<0.05$) by DMRT.

จากการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติมแบคทีเรียแลคติกแอซิดชนิดโปรไบโอติกและชนิดที่สร้างไนซิน (โยเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบเตย สตรอเบอรี่ สละและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) (Table 5) ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 34 คน จากผู้บริโภคที่คุ้นเคยกับการบริโภคนมถั่วเหลืองและโยเกิร์ตจากนม จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสละรองลงไปคือรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) รสสตรอเบอรี่ ส้ม แอปเปิ้ล และใบเตย ตามลำดับ ส่วนรสวานิลาและลิ้นจี่ มีคะแนนการทดสอบชิมที่แตกต่างจากรสนมถั่วเหลือง และได้คะแนนโดยรวมต่ำกว่า 5 ซึ่งน้อยกว่ารสสละ นมถั่วเหลือง ส้ม สตรอเบอรี่ และแอปเปิ้ล สำหรับรสใบเตยนั้นได้คะแนนรวมเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เช่นกันหากแต่ไม่มีความต่างจากนมถั่วเหลือง จึงมีแนวโน้มที่ผู้บริโภคจะให้การยอมรับได้ ผู้บริโภคทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น คะแนนคุณลักษณะได้แก่ ความหวาน สี ความหนืด ความเปรี้ยว กลิ่นและการยอมรับ โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.4 0.78 0.43 0.63 0.64 และ 0.69 ตามลำดับ โดยที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนของสีมีค่ามากที่สุด สีจึงเป็นคุณลักษณะที่มีความแตกต่างทั้ง 5 รสมากที่สุด รองลงไปได้แก่ การยอมรับรวม กลิ่น ความเปรี้ยว ความหนืด และความหวาน ตามลำดับ

สำหรับคุณลักษณะความเป็นกรด ได้แก่ pH อยู่ในช่วง 3.4 - 3.5 ปริมาณกรดซิตริกอยู่ในช่วง 1.3 - 2.0 และกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.9 - 0.6 ก. /100 ก. ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้อยู่ในช่วง 15 - 16 บริกซ์ และปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ในช่วง 17 - 18.5% โดยกรดที่พบส่วนใหญ่เป็นกรดซิตริกมากกว่ากรด

แลคติกเกือบเท่าตัว (Table 6) ทั้งในรสนมถั่วเหลืองและรสอื่นๆ ซึ่งเป็นกรดที่มีอยู่ในกลิ่นรสผลไม้ที่ใช้เติม ส่วนกรดแลคติกนั้นเป็นกรดที่เกิดจากการเติมเชื้อโยเกิร์ตคือแลคโตบาซิลลัสรวมทั้งเกิดจากแลคโตคอคคัสที่เติมลงไปเพื่อผลิตไนซิน

Table 6 Acidity pH soluble solid and total solid of soy milk yogurt

Flavour	pH	Citric acid[1](g/100g)	Lactic acid[1](g/100g)	Soluble solid (%)	Total solid (%)
Sara	3.42	2.06	0.93	15.6	17.7
Soy	3.44	1.36	0.64	15	17.03
Orange	3.48	1.86	0.87	15	17.59
Strawberry	3.43	1.93	0.9	15	18.51
Apple	3.4	1.83	0.86	15	17.47
Lychee	3.53	1.82	0.86	16	18.42
Bitouy	3.52	1.91	0.9	15.8	17.03
Vanilla	3.56	1.86	0.87	15	17.08

[1/]In house method based on Food Research International; HPLC analysis

ปริมาณแลคติกที่ต่ำยังเกี่ยวข้องกับสารอาหารจากกลูโคสและแลคโตสซึ่งไม่มีในนมถั่วเหลืองโดยที่ LAB ใช้กรดไพรูวิคในขบวนการเมแทบอริซึ่ม (Pyruvate as the principal final H receptor in metabolism)

$$\text{Lactose Galactosidase from LAB} \longrightarrow \text{D-Glucose + D- Galactose}$$

$$\text{Glucose} \longrightarrow \text{Pyruvic acid} \longrightarrow \text{Lactic acid}$$

การสังเคราะห์กาบ้า

1. ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA เบื้องต้น

จากการศึกษาความสามารถของ LABในสังเคราะห์ GABA ทำการศึกษาเบื้องต้นใน 3 สายพันธุ์คือ *Lb.* 8014 ,*Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ผลจาการตรวจสอบการสังเคราะห์ GABA ของ LABโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมกรดกลูตามิค 0.1% ทำการหมักภายใต้อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Lb.* 8014, *Lc.* 701007 และ *Lb.* 947 มีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA จากโมโนโซเดียมกลูตาเมต โดย *Lb.* 8014 มีความสามารถในการเปลี่ยน MSG เป็น GABA ได้สูงที่สุด จากนั้นจึงนำเชื้อ LAB ทุกสายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการหมักและการสังเคราะห์ GABA ด้วยวิธี Pickle pickling test เพื่อคัดเลือก LABที่มีความสามารถสูงที่สุดในการเปลี่ยน MSG เป็น GABA ต่อไป

2. ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ GADในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB

ทำการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ของ LABทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการทดสอบ Pickle Pickling Test และใช้วัตถุดิบเป็นผักกาดขาว เพื่อคัดเลือก LABที่สามารถสังเคราะห์ GABA และเติมMSG 3 ระดับคือ 0% 0.25% และ 0.50% โดยน้ำหนัก และเกลือที่ระดับ 0% 0.5% และ 1% โดยน้ำหนัก ทำการหมักภายใต้สภาวะ Anaerobic condition นาน 48 ชั่วโมง และตรวจวัดการเจริญของ LAB ทั้งสามสายพันธุ์ (Table 7)

Table 7 Growth ofLAB of 3 spicies after fermentation at 37^{o}C 48 hours

NaCl / **MSG**	0%	0.5%	1.0%
0%	-	++	+
0.1%	-	++	+

- \- means not foundLAB
- \+ means LAB > 10^3cfu/g
- ++ means LAB > 10^3cfu/g 10^7cfu/g

จากตาราง พบว่า LABไม่สามารถเจริญได้ในการทำ Pickle pickling test ที่มีปริมาณเกลือ 0% ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นของ MSGโดยจะเกิดการเน่าเสียก่อนครบเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นเป็น 0.5% LABจะสามารถเจริญได้ดีขึ้น แต่เมื่อปริมาณเกลือเพิ่มขึ้นถึง 1.0% โดยน้ำหนัก การเจริญเติบโตของ LABจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเกลือมีผลต่อการลดน้ำในผลิตภัณฑ์และทำให้แรงดันออสโมติค (Osmotic pressure) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป ค่าน้ำอิสระที่ลดลง จึงส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนั้นปริมาณเกลือที่เหมาะสมสำหรับ LAB คือ 0.5% โดยน้ำหนัก และปริมาณ MSG ที่ 0.1% โดยน้ำหนัก

3. คัดเลือก LAB ที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA

จากการทดลองทำ Pickle pickling test กับเชื้อ LABทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 โดยใช้ผักกาดขาวเป็นวัตถุดิบ กำหนดปริมาณเกลือที่ใช้เป็น 0.5% โดยน้ำหนัก และกำหนดปริมาณ MSG เป็น 0 และ 0.1% โดยน้ำหนัก ผลจากการทดลองพบว่า LABที่มีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA สูงที่สุดคือ *Lb.* 8014ซึ่งสามารถสังเคราะห์ GABA ได้เพิ่มสูงขึ้นถึง 162.10 มก./100 ก. เมื่อปริมาณ MSG เปลี่ยนแปลงจาก 0% เป็น 0.1% โดยน้ำหนัก รองลงมาคือ *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 ซึ่งมีสามารถในการสังเคราะห์ GABA ได้เพิ่มสูงขึ้น 157.02 และ 32.01 มก./100 ก. ตามลำดับ เมื่อปริมาณ MSG เปลี่ยนแปลงจาก 0% เป็น 0.1% โดยน้ำหนัก (Figure 8) ดังนั้น LAB ที่มีความสามารถสูงสุดในการสังเคราะห์ GABA คือ *Lb.* 8014 จึงเลือก LAB ชนิดนี้เพื่อทดลองในขั้นตอนต่อไป

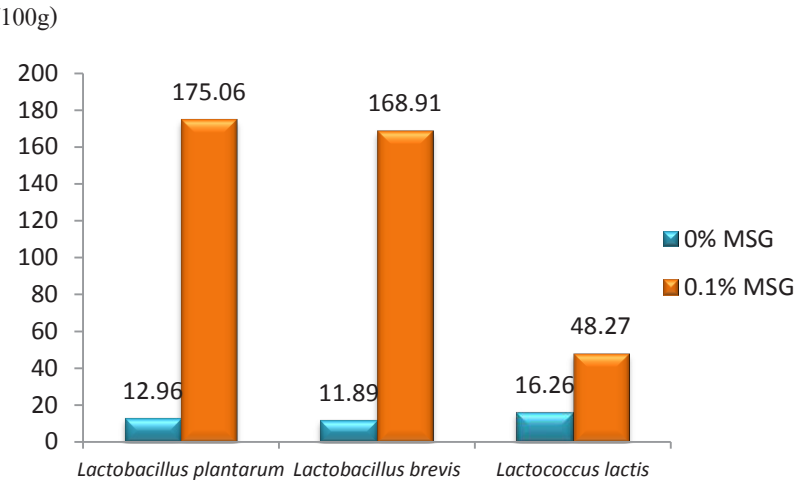


Figure 8 Synthesis of*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus brevis* NCIMB 947 and*Lactococcus lactis* NCIMB 701007 at 0 and 0.1% MSG by weight

4. ประยุกต์ใช้สภาวะของการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่มี GABA สูง

จากสภาวะในการสังเคราะห์ GABA ที่เหมาะสมในข้อ 3 จึงทำการทดลองประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์ GABA โดยใช้ *Lb.* 8014 และเปลี่ยนชนิดของวัตถุดิบเริ่มต้นจากผักกาดขาวเป็นผลิตผลเกษตรที่มีปริมาณกลูตามิคเริ่มต้นสูงได้แก่ เห็ดชนิดต่างๆ คือ เห็ดนางฟ้า เห็ดฟาง และเห็ดภูฐานผลจากการวิเคราะห์ปริมาณกลูตามิคเริ่มต้นในรูปของกรดแอลกลูตามิคและปริมาณ GABA เริ่มต้น (Table8) ผลจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดกลูตามิคในเห็ดทั้ง 3 ชนิด พบว่า เห็ดที่มีปริมาณกรดกลูตามิคสูงที่สุดคือ เห็ดนางฟ้า รองมาคือ เห็ดฟางและ เห็ดภูฐาน โดยปริมาณกรดกลูตามิคที่ตรวจวัดได้เป็น 5,044 4,109 และ 3,742 ก. ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเห็ดนางฟ้าเป็นวัตถุดิบในการประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์ GABA โดยใช้ *Lb.* 8014 ต่อไป

Table 8 Glutamic acid andGABA content in dry mushroom

Types of mushroom	Glutamic acid (mg/100 g)
Oyster mushroom	5,044
Straw mushroom	4,109
Indian oyster mushroom	3,742

จากการทดลองประยุกต์ใช้ประยุกต์ใช้สภาวะของการสังเคราะห์ GABA โดยใช้ *Lb.* 8014 ในการผลิตเป็นแหนมเห็นนางฟ้า โดยมีส่วนประกอบดังนี้

Table 9 Formula of fermented mushroom for GABA synthesization

Formula (g)	**1**	**2**	**3**	**4**
Steamed mushroom	750	750	750	750
Garlic	30	30	30	30
Sticky rice	100	100	100	100
MSG	2.75	0	2.75	0
Salt	17.6	17.6	26.4	26.4
Lb. 8014	3	3	3	3

จากการทดลองพบว่าหลังจาก 24 ชั่วโมง ของการหมักแหนมเห็ดนางฟ้าในทุกทรีทเมนต์ที่ 35-37°C.*Lb.* 8014 ได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า 10^8 cfu/g ส่งผลให้ pH ของแหนมเห็ดลดลงต่ำกว่า 4.5 และเมื่อตรวจวัดปริมาณกรดแลคติคในผลิตภัณฑ์จะอยู่ระหว่าง 0.3-0.23% โดยน้ำหนัก จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ปริมาณ GABA ในผลิตภัณฑ์แหนมเห็ด พบว่าในทุกทรีทเมนต์มีปริมาณ GABA ในระดับที่ต่ำคือ 1.42-1.56 มก./100 ก. แสดงให้เห็นว่าผลิตผลเกษตรที่มีปริมาณกรดแอลกลูตามิค (L-glutamic acid) เริ่มต้นในวัตถุดิบที่สูง แต่อาจจะอยู่ในรูปที่ LAB ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จึงทำให้ไม่เกิดการเพิ่มขึ้นของ GABA ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ดังนั้นผักกาดขาวจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ GABA โดย *Lb. Plantarum*8014 จากนั้นนำผักกาดขาวดองที่ได้มาผลิตเป็นแซนวิชสเปรด ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ เต้าหูขาว น้ำมันพืช น้ำตาล เกลือ น้ำส้มสายชู และผักกาดขาวดอง GABA สูง เมื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการพบว่าแซนวิชสเปรดผักกาดขาวดองมีคุณค่าทางโภชนาการ (Table 10)

Table 10 Nutritive values of Chinese cabbage of sandwich spread containing high GABA

Nutritive value of Chinese cabbage sandwich spread contained GABA (100 g of edible part)	
Total calories	213.18 Kcal
Total calories from fat	133.02 Kcal
Total fat	14.78 g
Saturated fat	2.56 g
Cholesterol	0.00 mg
Protein	2.86 g
Total carbohydrate	17.18 g
Fiber	2.76 g

Nutritive value of Chinese cabbage sandwich spread contained GABA (100 g of edible part)	
Sugar	6.01 g
Sodium	647.87 mg
VitaminA	-
VitaminB1	0.08 mg
VitaminB2	0.00 mg
Calcium	11.98 mg
Iron	0.78 mg
GABA	93.2 mg

จากตารางพบว่าการบริโภคแซนวิชสเปรดผักกาดขาว 100 ก. จะได้รับพลังงาน 213.8 กิโลแคลอรี คิดเป็นพลังงานจากไขมัน 133.2 กิโลแคลอรี โดยการบริโภคแซนวิชสเปรดผักกาดขาว 100 ก. จะได้รับ GABA 93.2 มก. ซึ่งถือว่าเป็นการได้รับ GABA ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับการบริโภคอาหารอื่นในปริมาณที่เท่ากัน (Table 11)

Table 11 GABA content in food products (Matsumoto *et al*. 1997)

Food Items	**GABA content (mg/100g)**
Dry tea	100-200
Melon	74.5
Tomato	62.6
Kimji	59.4
Chocolate	14.5
Brown rice	10.0
Pumpkin	9.7
Tofu	6.4

สรุปผลการทดลอง

การสร้างไนซิน

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดได้แก่ *Lc*.1401 *Lc*.1520 *Lb*.938 และ *Lb*.1034 เพื่อทดสอบการผลิตไนซิน โดยการวิเคราะห์เคลียร์โซนซึ่งไม่พบการสร้างไนซินสำหรับเชื้อ *Lc*.1401 *Lb*.938 และ *Lb*.1034ยกเว้น *Lc*.1520 พบว่ามีการสร้างไนซินในการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อนมถั่วเหลืองด้วยการหมักเชื้อ *Lc*.1520 ควบคู่กับ *Lb*.892 เพื่อช่วยเร่งอัตราความเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วและมีผลต่ออัตราการสร้างไนซินของเชื้อ *Lc*.1520 กล่าวคือปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc*.1520

ร่วมกับ *Lb.*892 ในเวลา 24ชั่วโมง มีปริมาณมากกว่าไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.*1520 อย่างเดียว ในเวลา 24 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)งานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรกว่าการใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไนซินทางการค้ามีความเป็นไปได้สูงสามารถลดต้นทุนได้เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ อีกทั้งถั่วเหลืองยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับผลกระทบจากการเปิดตลาดการค้าเสรีอาเซียน งานวิจัยนี้ยังได้ประยุกต์ใช้ประโยชน์จากไนซินในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยการเติมไนซินและการเติมเชื้อ *Lc.*1520 พบว่าการเติมไนซินโดยตรงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ ผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น มีผลให้แบคทีเรียแลคติกแอซิดซึ่งทำให้อาหารเกิดการบูดเปรี้ยวมีปริมาณลดลง ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการขยายผลการใช้ไนซินในการยับยั้งการบูดจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดและสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่นได้ นอกจากนี้แล้วการเติมเชื้อ *Lc.*1520 สามารถยืดอายุโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองให้มีรสเปรี้ยวน้อยลงโดยพบการสร้างไนซินในเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติม *Lc.*1520 (โยเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบเตย สตรอเบอรี่ สละและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 34 คน ผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสละ รองลงไปคือ รสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) รสสตรอเบอรี่ ส้ม แอปเปิ้ล และใบเตย ตามลำดับ ผู้ทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น อย่างไรก็ตามการบริโภคผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้นผู้บริโภคมีวัตถุประสงค์ต้องการบริโภคจุลินทรีย์แลคโตบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยไนซินเช่นกัน หากมีการเติมไนซินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผู้ผลิตจำเป็นต้องคำนึงถึงการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นด้วยจากผลการวิจัยการใช้ประโยชน์ของไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหารอาจนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆที่มีนมถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบได้ด้วย

การสังเคราะห์กาบ้า

จากการทดลองสังเคราะห์ GABA โดย LABทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *Lb.* 8014, *Lb.* 947 และ *Lc.* 701007 พบว่า *Lb.* 8014 มีความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ได้สูงที่สุดในการสังเคราะห์ GABA โดย LAB ไม่สามารถตัดสินได้จากปริมาณกรดกลูตามิคเริ่มต้นที่มีอยู่ในวัตถุดิบได้ การทำ pickle pickling test เริ่มต้น จะเป็นการทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ GABA ในเบื้องต้น LAB แต่ละสายพันธุ์จะเหมากับวัตถุดิบเริ่มต้นที่ไม่เหมือนกัน ดังนั้นหากต้องการใช้วัตถุดิบอื่นๆ ในการเพิ่มปริมาณ GABA จะต้องมีการศึกษาถึงสายพันธุ์ที่เหมาะสมด้วย

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

มีความเป็นไปได้ในการขยายผลการใช้ไนซินในการยับยั้งการบูดจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดและสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ เต้าหู้แผ่นได้และจากผลการวิจัยการใช้ประโยชน์ของไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหารสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆที่มีนมถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบได้ด้วยนอกจากนี้ในการเพิ่มปริมาณ GABA โดยการใช้

LABสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่างๆ ที่มีการใช้ LAB อยู่แล้ว เช่น ผักดอง กิมจิ โยเกิร์ต หรือ แหนม แต่อาจต้องมีการศึกษาถึงสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ GABA สูงสุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยนี้ ดร. เสริมสุข สลักเพ็ชร์ ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์เกษตร ผู้เชี่ยวชาญด้านวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้คำเสนอแนะ กลั่นกรองงานวิจัยเป็นอย่างดีและขอขอบคุณคณะนักวิจัยในโครงการวิจัยและพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการแปรรูปผลิตผลเกษตรเป็นอาหารทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

สำนักนิเทศ. 2552. สธ.จัด 152 หมู่บ้านนำร่องทำหมู่บ้านต้นแบบลดโรคเรื้อรังหวังลดอัตราการป่วยและเสียชีวิตของประชาชนจาก www.moph.go.th/show_hotnew.php?idHot_new=22869. กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์ 23; 145-160.

Ashton, H. 2014. THE BENZODIAZEPINES: WHAT THEY DO IN THE BODY. from http://www.benzo.org.uk/manual/bzcha01.htm.

Benkerroum, N. and Sandine, WE. 1988. Inhibitory Action of Nisin against *Listeriamonocytogenes*. *Journal of Dairy Science*. 71; 3237-3245.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biologinal Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *International Dairy Journal*. 16; 1058-1071.

FDA (U.S. Food & Drug Administration) /Federal Register. 1988. Nisin Preparation: Affirmation of GRAS Status as a Direct Human Food Ingredient. 21 CFR Part 184, *Fed Reg* 53; 11247-11251.

Gibbs, BF. Zougman, A., Masse R., Mulligan, C. 2004. Production and Characterization of Bioactive Peptides from Soy Hydrolysate and Soy-fermented foods. *Food Research International*. 37; 123-131.

Ishikawa, K., and Saito, S. 1978. Effect of Intraventricular γ-Aminobutyric Acid (GABA) on Discrimination Learning in Rats. *Psychopharmacology*. 56; 127-132.

JAICA andHiroshima Prefectural Food Research Center. 2007. เอกสารประกอบการฝึกอบรม Food Processing and Preservation Technology III.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiology Review*. 12; 39-89.

Korhonen and Pihlanto, A. 2003. Food Derived Bioactive Peptides-Opportunities for Designing Future Foods. *Curr Pharm Des*. 9; 1297-1308.

Matsumoto Y, Ohno K., and Hiraoka Y. 1997. Studies on the utilization of functional food materials containing high levels of gamma-aminobutyric acid (Part1). *Ehime Kougi Kenkyu Houkoku*. 35; 97-100.

Nettles, C.G., and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection*. 4; 338-356.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., and Nes, I.F. 1992. A Novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Journal of Bacteriology*. 174; 5686-5692.

Okada, T., Sugishita, T. Murakami. T., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R.,and Takahashi, T. 2000. Effect of the Defatted Rice Germ Enriched with GABA for Sleeplessness, Depression, Autonomic Disorder by Oral Administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.*47; 596-603.

Vermulapallli, S. and Barletta, M. 1984. The Role of the Sympathetic Nervous System in the Cardiovascular Effects of Systemically Administered γ-Aminobutyric Acid. *Arch. Int. Pharmacodyn*. 267; 46-58.

Yang, R., and Ray, B. 1994. Factors Influencing Production of Bacteriocins by LAB. *Food Microbiology*. 11; 281-291.

Wood, B.J.B., and Holzapfel, W.H. 1997. The Lactic Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, New York. p.7-15.

วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Detection and diagnosis of sugarcane white leaf disease by PCR method

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล [1/] ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ [1/] ทักษิณา ศันสยะวิชัย [1/] สุนี ศรีสิงห์ [2/]
รังสี เจริญสถาพร [3/] ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ [3/] กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ [4/]
Suchirat Sakuanrungsirikul [1/] Theerawut Wongwarat [1/] Taksina Sansayawichai [1/] Sunee Srisink [2/]
Rungsi Charaensataporn [3/] Praphan Prasertsak [3/] Kobkiat Paisancharoen [3/]

ABSTRACT

Quantification of a plant pathogen is essential to study its population dynamic in various conditions and to relate symptom expression with pathogen concentration. So far very few methods to quantify phytoplasma in plant tissues were published and no report on white leaf disease phytoplasmas quantification in sugarcane. We report here the first efficient detection and diagnosis methods of sugarcane white leaf disease by PCR that are simple to use and to interpret. These techniques were developed to enable the detection, quantification, differentiation of phytoplasmas including result assimilation that integrated information from the relevant researches. Detection of the phytoplasmas was targeted at two genes for enhancing precisions. The detection at 16S-23S rDNA by nested-PCR produces 700 bp fragment from the first PCR set and 210 bp from a nested-PCR. By these means however, contamination with other bacteria can also be observed due to the non-specificity of the primers. Confirmation of sugarcane white leaf phytoplasma infection was done by highly specific primers to the *secretory membrane protein translocation gene A (secA)* using direct PCR that resulted in 277 bp. Estimation of phytoplasma concentration of both techniques was achieved by comparing banding intensities of the samples against the standard samples. A precise quantification of phytoplasmas (copy number) is done by real-time PCR amplification of the *secA* gene using cloned plasmids with *secA* fragments as standard curves. The lowest concentration that set in accepting range is 100 copies/µl (25 ng plant DNA). Discrimination of the three phytoplasmas related to white leaf disease including sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS)and sugarcane green grassy shoot (SCGGS)was performed by High Resolution Melting (HRM) technique with primers designated to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 16S-23S rDNA region by nested-PCR manner.

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (Khon Kaen Field Crop Research Center)

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี (Supanburi Agriculture Research and Development Center)

[3] สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน (Field and Renewable Energy Crops Research Institute)

Five color codes designed by incorporating detection result, elements obtained from research pertinent and suggestion were integrated to ease users' understanding and success utilizing. This work was conveyed at Khon Kaen Field Crops Research Center during 2011-2013.Over 1260 sugarcane samples were subjected for phytoplasma detection and diagnosis in 2014 by these new techniques. White leaf incidents followed up in 10 research centers that submitted samples for investigation conformed to the incident possibility predicted by the designed color codes.

Key-words :sugarcane, white leaf disease, phytoplasma, detection, genetic variation, color code, quantification, realtime PCR, High resolution melting, HRM, SCWL, SCGS, SCGGS**,** secA**,** nested-PCR,16S-23S rDNA, SNPs**,** color codes

บทคัดย่อ

ปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่อพืชเป็นข้อมูลที่จำเป็นต่อการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของเชื้อในสภาวะต่างๆในงานวิจัย และการแสดงอาการของโรค ยังไม่มีรายงานการตรวจวัดปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยมาก่อนงานที่นำเสนอนี้ได้ปรับ ประยุกต์ต่อยอดผลงานวิจัยหลายงาน และพัฒนาวิธีการเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวในอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม่นยำ แปลผลง่าย และใช้งานได้จริง สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ ปริมาณเชื้อ แยกชนิดของเชื้อในอ้อย รวมทั้งวินิจฉัยโรคได้ วิธีการตรวจที่กล่าวมานี้ประกอบด้วยการตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากยีนเป้าหมายสองยีนเพื่อความแม่นยำของวิธีการ ได้แก่ ยีน 16S-23S rDNA ที่ตรวจด้วยวิธี nested-PCR ได้ผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 bp และ 210 bp ซึ่งใช้ระบุการติดเชื้อและประเมินปริมาณเชื้ออย่างคร่าวๆ ได้โดยการเทียบความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอ วิธีนี้ยังใช้บ่งชี้การปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ด้วยซึ่งเกิดจากความไม่จำเพาะของชุดไพร์เมอร์ ในการตรวจเพื่อยืนยันการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยนั้น ได้พัฒนาวิธีการขึ้นเพื่อตรวจดีเอ็นเอของเชื้อบนยีน *secretory membrane protein translocation gene A (secA)* มีขนาดชิ้นยีน 277bp การประเมินปริมาณเชื้อทำได้เช่นเดียวกับวิธีแรก การระบุจำนวนเชื้ออย่างละเอียด (จำนวนซ้ำ) ได้พัฒนาวิธีการตรวจที่ยีน *secA* ด้วยเครื่อง Realtime PCR โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นยีนนี้สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานสามารถตรวจได้ต่ำที่สุดคือ 100 copies/µlในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ในการแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมานั้น ได้พัฒนาเทคนิค High Resolution Melting (HRM) ที่ออกแบบไพร์เมอร์ให้ตรวจจับตำแหน่ง Single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนสายของยีน 16S-23S rDNA ใช้การเพิ่มปริมาณด้วยวิธี nested-PCR สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยทั้ง 3 ชนิดได้ คือ sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS)และ sugarcane green grassy shoot (SCGGS) โดยไม่ต้องใช้การตรวจลำดับเบส การแปลผลการตรวจได้มีพัฒนาใหม่โดยใช้รหัสสีขึ้นห้ารหัสพร้อมคำอธิบายผลและข้อแนะนำซึ่งได้จากประมวลผลการตรวจเชื้อและข้อมูลจากการศึกษาใน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้ผู้ใช้เข้าใจง่ายขึ้นและใช้งานได้จริง การพัฒนาวิธีทั้งหมดที่กล่าวมานี้ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นระหว่างปี 2554-2557ได้มีการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างอ้อยปี 2557 กว่า 1,260 ตัวอย่าง การติดตามการเกิดใบขาวในอ้อยตอในกลุ่มตัวอย่างในศูนย์วิจัยและ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร 10 ศูนย์ พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการคาดการณ์ด้วยรหัสสี

คำหลัก: อ้อย โรคใบขาว โรคกอตะไคร้ ไฟโตพลาสมา วิธีตรวจ ความแตกต่างของเชื้อ ปริมาณเชื้อ รหัสสี HRM Realtime PCR, nested-PCR, SNPs, รหัสสี

คำนำ

เชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดโรคใบขาวในอ้อยเป็นแบคทีเรียขนาดเล็ก ในกลุ่มแกรมบวก ไม่มีผนังเซลล์ มีจีโนมขนาดเล็กที่มีปริมาณ AT สูง (ประมาณ 70-80%; Oshima *et al*., 2004) ถูกจัดอยู่ในชั้นมอลลิคิวเตส (ClassMollicutes) ภายในวงศ์ไมโคพลาสมา (Family Mycoplasmataceae) ชนิด *Candidatus* phytoplasma กลุ่ม 16SrXI : Rice yellow dwarf group (Zhao, *et al*., 2010) อาศัยอยู่ในเซลล์ท่ออาหารของพืช ถ่ายทอดได้ด้วยเพลี้ยจั๊กจั่นสีน้ำตาล (Weintraub and Beanland, 2006; Hanboonsong *et al*., 2005,Matsumoto*et al.,* 1968) เชื้อนี้ไม่สามารถเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้ ทำให้ยังไม่มีวิธีกำจัดเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ต้นที่ไม่แสดงอาการอาจมีเชื้อมีเชื้อในปริมาณสูงหรือค่อนข้างต่ำและกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ต้องใช้เทคนิคที่มีความไวสูง เช่น เทคนิคพีซีอาร์ ในการตรวจ ซึ่งอาจเป็นการใช้เทคนิคแบบดั้งเดิม (conventional PCR) หรือเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (real-time PCR) การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามีการรายงานค่อนข้างน้อย และทั้งหมดตรวจด้วยการใช้เครื่อง Realtime PCR (Aldaghi *et al*., 2006, Torres *et al.* , 2005, Jarausch, *et al*., 2004) แต่ยังไม่มีรายงานในอ้อย

โรคใบขาวของอ้อยเป็นปัญหาสำคัญต่อผลผลิตอ้อยของไทย การระบาดที่รุนแรงเป็นวงกว้างเกิดจากการนำท่อนพันธุ์ติดเชื้อไปขยายพันธุ์ต่อ แหล่งระบาดที่แสดงอาการรุนแรงมักอยู่ในแหล่งปลูกที่เป็นทรายจัด หรือมีชั้นดานเทียมสูง เช่น ในเขตอีสาน หรือบางแหล่งในภาคกลาง สถาบันวิจัยพืชไร่ฯได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางและวิธีการในการแก้ปัญหาโรคใบขาวอย่างจริงจังในหลายสาขาวิชา ส่วนใหญ่ยังอยู่ในระหว่างศึกษา และทดสอบเทคโนโลยี มีการศึกษาถึงสาเหตุในการเกิดโรคและการแสดงอาการวิธีป้องกันกำจัด และการลดความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ โดยเป้าหมายคืออ้อยไม่มีอาการใบขาว หรืออุบัติการณ์ใบขาวลดลง ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายแนวคิดและวิธีการ เช่นทำให้อ้อยมีความแข็งแรงจากการปรับสภาพแวดล้อมและสมดุลธาตุอาหารให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต การจัดการเพื่อป้องกันหรือลดภาวะเครียดในระหว่างการเจริญเติบโต การคัดเลือกต้นที่มีปริมาณเชื้อน้อยหรือใช้ต้นปลอดโรค สำหรับขยายพันธุ์ การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเพื่อลดพื้นที่ระบาด หรือการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ต้นที่มีคุณลักษณะพิเศษทางพันธุกรรมที่ทำให้ทนโรคและควบคุมปริมาณเชื้อได้ งานวิจัยทั้งหมดนี้ล้วนต้องการข้อมูลการตรวจ

เชื้อ ปริมาณเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ (dynamics) หรือชนิดของเชื้อ ในการประกอบผลและวิเคราะห์ถึงความสำเร็จของวิธีการทั้งสิ้นรวมไปถึงการพยากรณ์การเกิดโรค หรือการศึกษาแมลงพาหะชนิดใหม่เพิ่มอีกด้วย

วิธีตรวจโรคใบขาวโดยทั่วไปในอ้อยนิยมใช้วิธี nested-PCR ซึ่งมีความไวสูง ใช้ไพร์เมอร์สองชุดสำหรับตรวจจับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)(Srivastava *et al*., 2006, Hanboonsong*et al*., 2005)นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นอีก เช่น ใช้ probe หรือวิธีทางอิมมูนโนวิทยา แต่ละวิธีมีข้อดีและเสียแตกต่างกัน แต่วิธีการเหล่านี้เป็นเพียงการตรวจว่าพบหรือไม่พบเชื้อเท่านั้น ที่ผู้ใช้นำผลตรวจที่ได้ไปใช้ได้อย่างจำกัด ยังไม่มีรายงานการตรวจปริมาณเชื้อที่ใช้เชื้อใบขาวเป็นค่าอ้างอิงอย่างแท้จริง ทำให้ผลการตรวจเป็นเพียงการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของพืชที่มีเชื้อรวมอยู่ด้วยเท่านั้น ไม่ใช่เทียบกับเชื้อใบขาวโดยตรงส่วนในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อนั้น ยังคงใช้วิธีการตรวจลำดับเบสที่ซับซ้อน มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน และใช้ผู้มีความชำนาญในการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งเป็นปัญหาในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการที่นอกจากใช้ตรวจว่ามีเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยหรือไม่แล้ว ยังสามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อ จำแนกชนิดของเชื้อที่ได้ผลทันทีและอ่านผลง่าย มีการวินิจฉัยโรคที่มีคำอธิบายผลที่ผู้ใช้สามารถนำไปขยายผลต่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดอุบัติการณ์ของโรคใบขาว

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ศึกษา: อ้อยที่เป็นโรคใบขาวอาการต่างๆ ได้แก่ อาการใบขาว อาการใบขาวร่วมกับกอฝอย อาการกอตะไคร้ จากแหล่งปลูกต่างๆ และหญ้าที่มีอาการใบขาว การเก็บรักษาตัวอย่างใบ ตามวิธีของ Wongwarat*et al*. (2011)

การสกัดดีเอ็นเอ: สกัดดีเอ็นเอจากใบโดยวิธี Li and Midmore (1999) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส บนอะการ์โรสเจลความเข้มข้น 1% ใน 0.5X TBE ย้อมผลด้วยสาร SYBR gold (Invitrogen, USA) ตรวจผลแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer **(**NanoMaestrogen, USA**)**

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่ง 16S-23S ISR ด้วย nested-PCR : ทำตามวิธีของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2554)ใช้ไพร์เมอร์ (MLO-X/ MLO-Y และ P1/P2) ตามรายงานของ Hanboonsong *et al*. (2005)

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่ง *secA* ด้วย direct-PCR : ทำตามวิธีของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2556; Sakuanrungsirikul *et al*., 2013)

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย Conventional PCR :สร้างพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน 16S-23S ISR และ *secA*โดยเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยีนทั้งสองชนิดนี้ สกัดดีเอ็นเอขนาด 700 bp จาก16S-23S ISR และ277 bp จาก *secA*ในagarose gel ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GEL/PCR

DNA Fragment Extraction Kit (RBCBioscience, Taiwan) สร้างโคลนแบคทีเรียที่มี พลาสมิดของชิ้นยีนทั้งสองชนิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป RBC TA cloning kit (RBC Bioscience, Taiwan)สกัดพลาสมิดที่มีชิ้นยีนด้วยชุดน้ำยาGF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia)หาความเข้มข้นของพลาสมิดมีหน่วยเป็น copy number ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณตามสูตรของWhelan et al. (2003) สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานด้วยการเจือจางพลาสมิดที่มีชิ้นยีนให้มีปริมาณเชื้อต่างกัน10 เท่าระหว่าง 1-10^{10} copies ใน ดีเอ็นเออ้อยปกติ 25 ng/µl ใช้เป็นต้นแบบเพิ่มปริมาณบริเวณยีนทั้งสองด้วย Conventional PCR ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น ประเมินปริมาณเชื้อด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่งยีน *secA* ด้วย Realtime PCR :สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ *secA*โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้น *secA* ที่มีปริมาณเชื้อต่างกัน 10 เท่า ดังกล่าวข้างต้นนำมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), ดีเอ็นเอต้นแบบ (25 ng/µl) 4 µl, 0.5 µM SecAfor/SecArev และ 0.075 µM dye SYTO9 (Invitrogen, CA,USA) ในปริมาตรรวม 15 µl นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Realtime PCR (LightCycler®480 Real-time PCR, Roche, Germany) ตามขั้นตอนดังนี้ 94 °C/5 นาที ตามด้วย 94°C/1 นาที, 60°C/30 วินาที, 72°C/45 วินาทีจำนวน 40 รอบและ 72°C/7 นาที วิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) ด้วยโปรแกรม Tm calling โดยเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72°C ถึง 95°C เพิ่ม 0.1°C/ วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงที่ 40°C/30 วินาที คำนวณปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรมAbs Quant/2nd Derivative Max สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานโดยให้ค่า PCR amplification efficiency (E) เท่ากับ 2 ($E = 10^{(-1/slope)}$) เพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ 100% efficiency (เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 เท่าในแต่ละรอบ) ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น

การจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) : ใช้การตรวจความแตกต่างลำดับเบสของเชื้อด้วย SNPs บนยีน 16S-23S rDNA ที่มีการขยายความยาวของสายดีเอ็นเอจาก 210 bp ซึ่งครอบคลุมบางส่วนของ 16S-ISR ให้มีความยาวขึ้นด้วยเทคนิค Primer walking ใช้*Candidatus Phytoplasma* cynodontis (AB741630.1) จากฐานข้อมูล NCBI เป็นตำแหน่งในการสร้างไพร์เมอร์ตั้งต้น ออกแบบไพร์เมอร์ได้จำนวน 4 คู่ดังนี้

16S-23S F1 :	AGTTTGATCCTGGCTCAGGATA	16S-23S R1:	CATAGTTTGCCGGGGCTTA
16S-23S F2	GAACGATGAAGTATTTCGGTA	16S-23S R2	GCTCGTTTTAGGACTTAACCTAAC
16S-23S F3	GCACAAGCGGTGGATCATG	16S-23S R3	TGTGTACAAACCCCGAGAACG
16S-23S F4	GCAGTCTCAGTTCGGATTGA	16S-23S R4	CCGTTAATTGCGTCCTTCA

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของอ้อยและหญ้าที่มีอาการใบขาวที่มีการศึกษาแล้วในการวิจัยความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้า จากลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ 16S-23S ISR (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2555; Sakuanrungsirikul, *et al*., 2013) จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ SCWL,

SCGS และ SCGGS ชนิดละ 2 ตัวอย่าง และหญ้า 1 ตัวอย่างเป็นต้นแบบในการขยายความยาวสายด้วยเทคนิค Primer walking โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.33 µM Primer (Forward/Reverse mix), 0.1 U Taq polymerase and 100 ng/µl DNA template 3 µl ในปริมาตรรวม 15 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) มีขั้นตอนดังนี้ 94 °C/5 นาที, ตามด้วย 35 รอบของ 94°C/40 วินาที, 52°C/ 40 วินาที และ 72°C/1 นาที ตามด้วย 72°C/7 นาทีตรวจผลด้วย Electrophoresis สกัดชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit และส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Firstbase, Malaysia) จัดเรียงข้อมูลลำดับเบส16S-23S rDNA ของ SCWL, SCGS, SCGGS และหญ้าที่ยาวขึ้นนี้ด้วยโปรแกรม Clustal W วิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความแตกต่างเพียงหนึ่งเบส (SNPs) ออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย nested-PCR ดังนี้ ชุดที่ 1 (16S-23S F1: AGTTTGATCCTGGCTCAGGATA / 16S-23S R1 CATAGTTTGCCGGGGCTTA) ครอบคลุมตำแหน่งที่ 1 ถึง 498 (ขนาดผลผลิต 498 bp) ชุดที่ 2 (Phyto7F:GGCTTGCGTCACATTAGTTAG / Phyto7R: CAACCTCTCAGTCCAGCTACAC) ครอบคลุมตำแหน่งที่ 220 ถึง 294 (ขนาดผลผลิต 75 bp) มีขบวนการในการเพิ่มปริมาณ 2 ขั้นตอน คือ (1) Direct PCR ประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.33 µM Primer (16S-23S F1/R1), 0.1 U Taq polymerase และ 100 ng/µl DNA template 3 ulในปริมาตรรวม 15 µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) ดังนี้ 94 °C/5 นาที ตามด้วย 30 รอบของ94°C/1 นาที, 60°C/ 30 วินาที และ722°C/45 วินาที ตามด้วย 72°C/7 นาที (2) nested-PCR:ใช้ผลผลิตจากขั้นที่ 1 เจือจาง 1:200 เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 15 µl ที่ประกอบด้วย 1x buffer, 2mM $MgCl_2$, 1.2 mM dNTP, 0.2 µM Primer (Phyto7F/R), 0.1 U Taq polymerase และ DNA template 3 µl, 0.075 µM dye SYTO9 (Invitrogen, CA,USA) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องRealtime PCR (LightCycler® 480 Real-time PCR, Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ 94 °C/5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94°C/30 วินาที, 64°C/30 วินาที และ72°C /40 วินาที แล้ววิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) โดยเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72°C ถึง 95°C : 0.03°C/ วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงที่ 40°C/30 วินาที วิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรม Gene Scanning (LightCycler®480 instrument with software version 1.5) การจำแนกชนิดของเชื้อในตัวอย่างทดสอบดำเนินการเช่นเดียวกัน

สถานที่ดำเนินการดำเนินการทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ระหว่างปี 2554-2557

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างง่ายด้วย Conventional PCR : ใช้การตรวจยีนเป้าหมายสองชนิดเพื่อความแม่นยำของวิธีการ ได้แก่ ยีน 16S-23S rDNA ซึ่งตรวจด้วยวิธี nested-PCR

และ ยีน *secA* ตรวจด้วยวิธี direct PCR ทั้งสองวิธีมีข้อดีและเสียแตกต่างกัน nested-PCR มีข้อดีคือ สามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณต่ำมากได้ เพราะดีเอ็นเอเป้าหมายถูกนำมาเพิ่มปริมาณซ้ำใหม่ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์สองชุด แต่มีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายและเกิดผลบวกปลอมได้ง่าย จึงต้องตรวจควบคู่ไปกับปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยทุกครั้ง ความแม่นยำของวิธีการขึ้นกับความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ ตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย และสภาวะในทำ PCR หากใช้อุณหภูมิในการเกาะจับของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายสูงเกินไปจะทำให้ไพร์เมอร์เกาะได้ไม่เต็มที่ เกิดผลลบปลอมที่ส่งผลเสียหายอย่างมากเมื่อนำผลตรวจไปขยายหรือปลูกในปริมาณมาก การตรวจยีน *secA* นั้นใช้วิธี direct PCR คือใช้ PCR เพียงชุดเดียว การปนเปื้อนเกิดได้น้อย แต่มีข้อเสียคือมีความไว (sensitivity) ต่ำกว่าวิธี nested-PCR ความแม่นยำ (precision) ขึ้นกับความจำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยยีน 16S-23S rDNA ใช้ไพร์เมอร์ตามรายงานของ Hanboonsong (2005)และประยุกต์วิธีการโดยปรับองค์ประกอบของปฏิกิริยาและสภาวะ PCR ใหม่ เพื่อลดการเกิดผลลบปลอมและพัฒนาใหม่ให้สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อได้สามารถแสดงผลผลิตของปฏิกิริยาชุดแรก (direct PCR) ขนาด 700 bp ได้ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณส่วนกลางของ 16S ผ่าน ISR จนถึงส่วนต้นของ 23S ซึ่งเป็นบริเวณที่นิยมใช้สร้างไพร์เมอร์ชนิด universal primer สำหรับตรวจและจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไป (Deng and Hiruki, 1991; Ahrens and Seemuller, 1992; Lee, et al., 1993) เมื่อนำดีเอ็นเอขนาด 700 bp นี้ มาเจือจางให้ความเข้มข้นต่างกันแล้วเพิ่มปริมาณ พบว่าระดับความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่ได้สอดคล้องกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น สามารถเห็นแถบจากการใช้พลาสมิดตั้งต้นที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 copies จนถึง 10^4copies/µl (ใน 25 ng DNA) ซึ่งเป็นจุดคงที่ของความเข้มแสง เมื่อนำส่วนผลผลิต PCR ขนาด 210 bp ที่ได้จากขบวนการ nested-PCR ของดีเอ็นเอตั้งต้นตั้งแต่ 1-10^4copies/µl นั้นมีความเข้มแสงเท่ากัน (Fig. 1A) อย่างไรก็ตามความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอขนาด 210 bp นี้จะจางลงหากมีดีเอ็นเอตั้งต้นมีน้อยกว่า 1 copy/µl (Fig. 1B) ในตัวอย่างที่มีการติดเชื้ออื่นซ้ำซ้อน จะเกิดแถบอื่นๆ ที่รบกวนการแปลผล เกิดจากความไม่จำเพาะของไพร์เมอร์ดังกล่าวมาแล้ว ที่จับกับดีเอ็นเอของไฟโตพลาสมาในพืชอื่นๆ ได้ เช่น หญ้า พง เลา มันสำปะหลัง รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิดภายในต้นเช่น *Bacillus* spp., *Staphyllococcus* spp. และ *Bacteriodes* spp. (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Harrison *et al*., 2002) มักพบในตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือตัวอย่างจากแปลงที่มีอาการของโรคอื่นด้วย เช่น ใบลวก ราสนิม เป็นต้น (Fig. 1C)ในการตรวจเพื่อยืนยันผลการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยควบคู่ไปด้วยนั้น ใช้ไพร์เมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อเชื้อนี้ที่ตำแหน่งยีน *secA* ได้ผลเป็นชิ้นยีนขนาด 277 bp (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungsirikul *et al*., 2012)สามารถใช้ประเมินปริมาณเชื้อจากความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน (Fig. 1D) แต่เนื่องจากเป็นการทำปฏิกิริยา direct PCR จึงทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอได้ต่ำสุดที่ 10^2copies/µl เท่านั้น ในกรณีที่มีตัวอย่างเป็นจำนวนมาก และไม่ต้องใช้รายละเอียดของจำนวนเชื้อ

มาก สามารถใช้วิธีกำหนดระดับความเข้มของแถบเป็นระดับได้ ตั้งแต่ระดับต่ำ 1+ ถึงสูง 4+ คือ มีเชื้อตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^4copies/µl พบว่าระดับเชื้อ 10^3copies/µl เห็นอาการใบขาวแล้ว (Table 1)

การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยยีน *secA* โดย absolute quantification realtime PCR : งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย Real time PCR ที่มีการใช้ชิ้นยีนของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบความเข้มข้นของเชื้อ Soufi (2012) รวมทั้งรายงานอื่นที่ตรวจเชื้อนี้อ้อยด้วย Real time PCR ใช้วิธีตรวจ 16S-23S rDNA ที่เป็นบริเวณที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียหลายชนิดดังกล่าวแล้วข้างต้น และใช้วิธีเจือจางดีเอ็นเอของอ้อยที่มีอาการใบขาว หรือใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นแพงพวยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมามาเปรียบเทียบแทน ดังนั้นปริมาณที่ตรวจได้จึงไม่ใช่ปริมาณของเชื้อใบขาวที่แท้จริง การใช้วิธีนี้ในการเปรียบเทียบความเข้มข้นค่อนข้างซับซ้อน เพราะจำนวนซ้ำของยีนในจีโนมของเชื้อแต่ละชนิดมีไม่ต่ำกว่า 2 ชุด หากใช้ต้องทำการโคลนชิ้นยีนให้ได้เพียงชุดเดียวในพลาสมิด จึงใช้เปรียบเทียบได้ แต่ในรายงานนี้ใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่มาใช้ตรวจ ที่จำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยที่ตำแหน่งยีน *secA* ซึ่งมีเพียงชุดเดียวในจีโนม (Bekele, et al., 2011) และใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *secA* สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นจึงเป็นปริมาณที่แท้จริงของเชื้อนี้ในเนื้อเยื่อพืช (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungsirikul *et al*., 2012)

Real-Time PCR หรือ Quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่สามารถคำนวณหาค่าประสิทธิภาพ ค่าความเข้มข้น หรือปริมาณสารพันธุกรรมเริ่มต้นได้โดยใช้สารเรืองแสงเป็นตัวแสดงผล (reporter) สามารถแสดงผลให้เห็นได้ทันทีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา ค่าสำคัญที่เกี่ยวข้องในเทคนิคนี้ ได้แก่ ค่า Threshold Cycle (Ct) ซึ่งหมายถึงรอบของการเพิ่มปริมาณที่เครื่องสามารถตรวจหาดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาได้ หากดีเอ็นเอตั้งต้นมีน้อยต้องใช้รอบในการเพิ่มปริมาณหลายรอบกว่าจะตรวจพบสัญญาณเรืองแสง ทำให้มีค่า Ct สูง การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น ทำโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาเพิ่มปริมาณและสร้างเป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานสำหรับเทียบ และอีกค่าหนึ่ง คือ melting temperature (Tm) เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกัน ความแตกต่างของค่า Tm จะแปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของสายดีเอ็นเอคู่นั้นๆ ดังนั้นค่า Tm จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกความแตกต่างของผลผลิต PCR ซึ่งใช้งานได้ง่ายไม่ซับซ้อน แต่ประสิทธิภาพอาจไม่มากเท่ากับการตรวจลำดับเบส

กราฟความเข้มข้นมาตรฐานและค่า PCR amplification efficiency (E) :การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ทำโดยเทียบค่า Ct กับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของพลาสมิดต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง 1-10^{10}copies/µl ค่า Ct ของพลาสมิดที่มีความเข้มข้นสูงสุด (10^{10}) จะมีค่าต่ำโดยกราฟแสดงการเพิ่มปริมาณตั้งแต่รอบที่ 8 ขณะที่พลาสมิดที่มีต่ำ (1-10 copies) พบกราฟในรอบที่ 40 และมีการโค้งที่ไม่สูงมาก (Fig.2A) ผลการวิเคราะห์ค่า Tm พบว่าพลาสมิดความเข้มข้น10^2-10^{10}copies ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 77.10 °C เพียงค่าเดียวเท่านั้น จึงถูกใช้เป็นค่า Tm ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วน

พลาสมิดที่ 1และ 10 copies มีค่า Tm ที่ 73.22°C และ 77.10°C ตามลำดับ ซึ่งค่า Tm ที่ 73.22°C คาดว่าเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer) (Fig. 2B) การคำนวณค่า efficiency (E) พบว่าพลาสมิดช่วงความเข้มข้น10^{2}-10^{10}copies นั้นตกอยู่ในช่วงที่กราฟมีความลาดเอียง (slope) ที่มีค่าเท่ากับ -3.524 หมายถึงต้องใช้ 3.524 รอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียง 10 เท่าตามความเข้มข้นตั้งต้นที่เจือจางต่างกัน 10 เท่าหรือมีค่า Ct ต่างกันเท่ากับ 3.524 รอบ ($2^{3.524}$= 11.5) เมื่อนำค่าความลาดเอียงมาหาค่า E ได้ค่าเท่ากับ 1.922 แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวน 1.922 เท่าซึ่งใกล้เคียงกับ 100% efficiencyในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนั้นช่วงความเข้มข้นของพลาสมิด สูงสุดและต่ำสุดที่นำมาใช้ในการประเมินได้คือ 10^{2}-10^{10}copies ส่วนช่วง 1- 10copies นั้นตกอยู่นอกส่วนที่มีความลาดเอียง จึงเป็นช่วงค่าที่ไม่น่าเชื่อถือ และไม่ควรนำมาใช้ (Figure 2C) ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่มีความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยต่างกัน 3 ระดับ คือใบขาว ใบขาวปนเขียว และใบเขียว (ไม่มีอาการ) พบว่าปริมาณเชื้อเกี่ยวพันกับระดับอาการ อ้อยใบขาวมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามากที่สุด คืออยู่ในระดับ 10^{5}copies ในใบขาวปนเขียวมีเชื้อในระดับ10^{3}-10^{4}copies ส่วนใบเขียวไม่สามารถตรวจได้ (Table 1) ซึ่งคาดว่ามีเชื้อน้อยกว่า 10^{2}copies การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีน้อยเช่นนี้ เช่น 4-340 cells/ g ต้องใช้เทคนิค nested PCR มาตรวจสอบ (Berges *et al*., 2000)

การจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค HRM : การใช้ HRM ในการแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอเริ่มมีการใช้งานมากขึ้นส่วนใหญ่เป็นรายงานที่ใช้ในทางการแพทย์ (Zianni *et al*., 2013, Areekit *et al*., 2009) เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ให้ผลทันที ใช้ง่ายแปลผลง่าย ไม่ต้องตรวจลำดับเบสซึ่งใช้ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เครื่องมือราคาแพง มีความซับซ้อน ใช้เวลาและใช้ความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์และแปลผล เทคนิค HRMใช้ค่า Tm เป็นหลักในการแยกผลผลิต PCR ที่ต่างกันซึ่งทำโดยออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งที่มีความแตกต่างนั้น โดยมีขนาดของผลผลิต PCRไม่เกิน 100 bp เพื่อประสิทธิภาพการแยกความแตกต่างเบสที่ชัดเจน การพัฒนางานในส่วนนี้ต่อยอดงานวิจัยจากเรื่องการศึกษาความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยและหญ้าใบขาวจากแหล่งปลูกต่างๆ ทั่วประเทศไทย (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungsirikul *et al*., 2012) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาพัฒนาต่อให้สามารถตรวจความแตกต่างของชนิดเชื้อได้ ซึ่งจากรายงานดังกล่าวนี้ได้ศึกษาลำดับเบสของยีน16S- ISR ความยาว 210 bp และ secA ความยาว 277 bp ของกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่มใหญ่ คือ SCWL, SCGS และ SCGGS และพบว่ามีเบสต่างกันค่อนข้างน้อยแยกกันได้ไม่ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่าง SCWL และ SCGS เพราะขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ของทั้งสองยีนนั้นสั้นเกินไป การพัฒนาวิธีแยกความแตกต่างด้วย HRM นั้นต้องทำการขยายความยาวของชิ้นยีนที่ได้ให้ยาวขึ้น เพื่อให้มีตำแหน่งแตกต่างมากขึ้น สำหรับสำรวจหาตำแหน่งที่มีเบสต่างกันที่ใช้แยกชนิดของเชื้อได้อย่างชัดเจน ผลจากการใช้เทคนิค Primer walking ทำให้ได้ลำดับเบสของตำแหน่ง 16S-23S rDNA ของ SCWL, SCGS, SCGGS และหญ้าที่มีอาการใบขาวยาวขึ้นครอบคลุม 16S-ISR-23Sบางส่วนโดยได้ขนาดใหม่เท่ากับ 1770, 1771, 1772 และ 1780 bp ตามลำดับ มีตำแหน่ง

แปรปรวน (SNPs) จำนวนรวม 71 ตำแหน่ง กระจายอยู่ทั่วทั้งสายที่เป็นทั้งชนิดแทรก (Insertion) ขาดหาย (Deletion) และแทนที่ (Substitution) ของเบสในจำนวนนี้มี SNPs 3 ตำแหน่ง ที่คัดเลือกเพื่อใช้แยกเชื้อทั้ง 4 ชนิดได้ ได้แก่ ตำแหน่งที่ 245 แยก SCGGS ออกจาก SCWL และ SCGS (SCGGS/GRASS (T) : (C) SCWL/SCGS) ตำแหน่งที่ 254 แยก SCGS ออกจากเชื้อ SCWL (SCGGS/SCGS (G) : (A) SCWL, GRASS) ตำแหน่ง 267 แยกเชื้อของอ้อยออกจากหญ้าใบขาว (SCGGS/SCWL/ SCGS (T) : GRASS (C) ไพร์เมอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการแยกชนิดของเชื้อนี้ ไพร์เมอร์ชุดที่ 1 ให้ขนาดของผลผลิต 498 bp ครอบคลุมตำแหน่งที่ 1 ถึง 498 ส่วนไพรเมอร์ชุดที่ 2 ได้ผลผลิตขนาด 75 bp ครอบคลุมตำแหน่งที่ 220 ถึง 294 ที่มีตำแหน่ง SNPs ที่ต้องการอยู่ ผลการทดสอบกับตัวอย่าง SCWL, SCGS, SCGGS และหญ้าที่แสดงอาการใบขาว พบว่า melting curves แสดงกราฟแยกกัน 4 กราฟ มีค่า Tm ของเชื้อทั้ง 4 ชนิด คือ 80.30°C, 80.75°C, 79.92°C และ 80.63°C ตามลำดับ (Fig. 3A) แต่ละชนิดมีลักษณะเป็น peak เดี่ยวชัดเจนไม่ปรากฏ peak อื่นๆ หรือ primer dimer แสดงถึงความจำเพาะของไพรเมอร์สูง และความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene scanning ที่แสดงผลเป็นmelting curves จะเห็นการแยกได้ชัดเจนกว่าการใช้ค่า Tm (Fig.3B) จากตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของไพรเมอร์และวิธีการของ HRM ที่ได้นี้ด้วยอ้อยใบขาวอีก 38 ตัวอย่างได้แก่ SCWL 15 ตัวอย่าง SCGS 19 ตัวอย่าง SCGGS 4 ตัวอย่างซึ่งมีการตรวจลำดับเบสและจำแนกกลุ่มด้วย phylogenetic tree แล้วนั้น (สุจิรัตน์ และคณะ, 2555) พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน (Fig. 3C) การทดสอบวิธีการนี้เพิ่มเติมโดยใช้เชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดอื่น ได้แก่ *Erianthus* spp และลูกผสมระหว่าง *Erianthus* กับอ้อย จำนวน 200 ตัวอย่าง พบว่ามีค่า Tm แตกต่างกัน แสดงว่าเชื้อในตัวอย่าง *Erianthus* spp. นั้นไม่ตรงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย ส่วนเชื้อที่พบในลูกผสมระหว่าง *Erianthus* spp. กับอ้อย พบว่าเกือบทั้งหมดตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยชนิด SCWL หรือ SCGS ด้วยวิธีนี้ได้ (ไม่ได้แสดงผล) แสดงถึงความแม่นยำของวิธีการที่พัฒนาใหม่นี้ในการจำแนกชนิดของเชื้อได้ ส่วนการเพิ่มความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* เป็น 377 bp ด้วยเทคนิค Primer walking พบความแปรปรวนระหว่างลำดับเบสของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดนี้จำนวน31 ตำแหน่ง กระจายในภายในสายดีเอ็นเอและเป็นชนิด substitution แต่การกระจายตัวยากต่อการคัดเลือกตำแหน่งสำหรับนำมาใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์ จึงไม่ได้นำมาใช้ในการพัฒนาวิธีการ

ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาและการแสดงอาการใบขาว : การแสดงอาการใบขาวของอ้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งปริมาณเชื้อภายในต้น ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นอ้อยเครียด ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้นอาจไม่สัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดอาการใบขาว แม้จะมีเชื้อภายในต้นปริมาณมากแต่อาจจะยังไม่แสดงอาการใบขาวได้ Soufi (2012) ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวนมากภายใน sieve element ของใบอ้อยที่ติดเชื้อใบขาวที่มีอาการตั้งแต่ใบขาว ใบขาวเขียว และใบเขียว เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบเชื้อ กอบเกียรติ และคณะ (2554) พบว่ากลุ่มอ้อยที่มีการ

ให้น้ำเสริมมีการแสดงอาการใบขาวน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ให้น้ำ แม้จะตรวจพบเชื้อไฟโพลาสมาในปริมาณสูง (มากกว่า 10^2copies/µl) จากการสำรวจอ้อยในแหล่งปลูกภาคกลางที่มีสภาพดินน้ำดี เหมาะต่อการปลูกอ้อย หลายตัวอย่างตรวจพบเชื้อในปริมาณสูงแต่ยังไม่มีอาการใบขาว แต่เมื่อนำมาปลูกขยายต่อในแหล่งดินทราย จะแสดงอาการใบขาวได้ ซึ่งมักเกิดหลังจากอ้อยผ่านช่วงแล้งจัดและมีฝนเมื่ออ้อยเริ่มงอกและพบใบขาว ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่มักพบได้ทุกปีในภาคอีสาน และแหล่งดินทรายจัด แต่ความรุนแรงของอาการใบขาวหลังจากอ้อยแสดงอาการแล้วนั้นขึ้นกับปริมาณเชื้อ (Table 1) Martini *et al.* (2011) ทำการศึกษาใน *Prunus* spp. ที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าความรุนแรงของโรคขึ้นกับระดับปริมาณเชื้อในต้นนั้นๆ โดยทั่วไปเมื่อพืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ขบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นคือพืชจะสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ขึ้นอย่างมากเพื่อใช้กำจัดเชื้อโรค ทำให้พืชเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidation stress) จาก ROS นี้ด้วยเพราะเกิดความเสียหายกับสภาวะทางสรีระบางอย่างภายในต้นพืชเอง (Jones, 2006) มีรายงานการเกิดภาวะเครียดนี้ในพืชหลายชนิดที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา การลดความเสียหายจากเชื้อด้วยการใช้สารบางชนิดพบว่าทำให้มีปริมาณ H_2O_2 และ ascorbic acid ที่มีบทบาทสำคัญภาวะออกซิเดชั่นนี้มากขึ้น แต่มีกิจกรรมเอ็นไซม์ peroxidase ที่ลดลง (Sánchez-Rojo, et al., 2010) จากรายงานของศุจิรัตน์และคณะ (2557) พบว่า อ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมามีภาวะเครียดออกซิเดชั่นเช่นกัน ในอ้อยที่มีอาการใบขาวมีกิจกรรมเอ็นไซม์ APX (ascorbate peroxidase) และมีปริมาณ H_2O_2 สูงกว่าปกติประมาณ 2 เท่า พบสาร Proline ที่สร้างเมื่อพืชอยู่สภาวะแล้งหรือขาดน้ำสูงกว่าปกติประมาณ 2-3 เท่า แสดงว่ามีภาวะเครียดออสโมติก (osmotic stress) ร่วมด้วย กอบเกียรติ และคณะ (2553) รายงานว่าปริมาณน้ำในใบอ้อยที่แสดงอาการขาวมีน้อยกว่าในใบที่ไม่มีอาการประมาณ 2 เท่า ตรวจพบสาร Malondialdehyde (MDA) สูงขึ้นกว่า 1 เท่าในอ้อยที่มีอาการใบขาว แสดงถึงสภาวะที่เซลล์ถูกทำลาย ภาวะเครียดนี้เหล่านี้ทำให้อ้อยอ่อนแอลง การทดลองโดยใช้อ้อยอายุ 2 เดือน ที่มีปริมาณเชื้อสูงตรวจด้วยวิธี PCR แต่ยังไม่แสดงอาการใบขาว ซึ่งได้จากการเพาะข้ออ้อยที่มียอดขาวในกระบะทราย สร้างภาวะเครียดจากแล้งและความร้อน (39°C, 20,000 LUX :12/12 สว่าง/มืด, 55% RH) ในตู้ควบคุมเป็นเวลา 3 วัน แล้วให้น้ำหลังการทดสอบอีกประมาณ 14 วัน พบว่าเกือบทั้งหมดแสดงอาการใบขาวหลังจากใบคลี่แล้ว แต่ต่อมาใบที่ขาวแล้วนั้นจะกลับเป็นใบเขียวได้อีก แสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดอาการใบขาว แต่การทดสอบในอ้อยที่มีเชื้อในปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 10^2copies/µl) จะยังไม่แสดงอาการใบขาวในสภาพดังกล่าวแม้จะแสดงอาการขาดน้ำและมีการสร้าง Proline ในปริมาณที่สูงมากกว่า 3 เท่าหลังการทดสอบเทียบกับอ้อยชุดควบคุม (ศุจิรัตน์และคณะ (2557) ดังนั้นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดใบขาวในอ้อยจึงประกอบด้วยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้นและสภาวะแวดล้อมที่มากระตุ้น จึงมักพบอุบัติการณ์ใบขาวในปีที่มีสภาวะแล้งยาวนาน แล้วตามด้วยฝนหลังจากอ้อยฟื้นตัวจากการรับน้ำ Martini et al. (2011) รายงานว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใน *Prunus* spp. จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโต (vegetative season) ในกลุ่มดินเนื้อหยาบ (ทรายจัด) ที่ไม่อุดมสมบูรณ์ รวมถึงดินที่มีชั้นดานเทียมสูง

กว่าปกติ หรือการมีน้ำท่วมขัง เป็นปัจจัยที่สร้างภาวะเครียดให้อ้อยได้เช่นกัน นอกจากนี้อาการใบขาวมักพบได้มากในอ้อยตอที่มีประสิทธิภาพการดูดใช้น้ำและอาหารได้ลดลง (กอบเกียรติ และคณะ, 2553) ดังนั้นคำแนะนำในการลดความเสียหายจากโรคใบขาวจึงประกอบด้วย การเลือกใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค การบริหารจัดการที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ การปรับปรุงดิน การจัดการธาตุอาหารและน้ำที่เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดสภาวะเครียดในอ้อย

การวินิจฉัยผลการตรวจโรคใบขาวและการรายงานผลด้วยรหัสสี: การรายงานผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย Conventional PCR ใช้การดูผลจากการตรวจทั้งสองยีน คือ 16S-23S rDNA ซึ่งได้ผลเป็นดีเอ็นเอขนาด 700 bp และ210 bp และ *secA* ที่มีขนาด 277 bp ประกอบกันจากข้อดีและข้อเสียของทั้งสองวิธีดังกล่าวมา วิธีกำหนดปริมาณเชื้อใช้การเทียบความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอ ที่กำหนดความเข้มของแถบจากน้อยไปมากเป็น 1+ ถึง 4+ โดยเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่เป็นใบขาว ซึ่งง่าย และรวดเร็ว แต่จากประสบการณ์การรายงานด้วยวิธีดังกล่าวประสบปัญหาว่าผู้ใช้ไม่เข้าใจความหมายของข้อมูลที่แบ่งเป็นระดับบวกของยีนทั้ง 3 ตำแหน่งที่ใช้ ไม่เข้าใจถึงความสัมพันธ์ของระดับเชื้อที่ได้จากรายงานและพัฒนาการของเชื้อและอาการในสภาพแวดล้อมที่ปลูกเพราะขาดคำแนะนำจากผลตรวจสำหรับนำไปปรับหรือขยายผลต่อในแปลงได้ ทำให้งานด้านการแก้ไขปัญหาโรคใบขาวไม่ก้าวหน้าเท่าที่ควร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ปรับพัฒนาวิธีการรายงานผลใหม่ นอกจากมีผลของระดับปริมาณเชื้อแล้ว ยังกำหนดระดับความปลอดภัยในการนำไปใช้ต่อและคำแนะนำในการดูแลรักษาในแปลง รวมถึงการคาดการณ์การแสดงอาการใบขาวในรุ่นอ้อยตอด้วย จากระดับอาการใบขาว 3 ระดับ คือ ขาว ขาวเขียว และเขียวนั้น มีช่วงของของปริมาณเชื้อตรวจด้วย q-Realtime PCR คือ 10^5, 10^3-10^4 และ 10^2 copies/µl หรือต่ำกว่า ตามลำดับ (Table 1)ในจำนวนนี้กลุ่มใบเขียวเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญที่สุดเพราะมีกลุ่มอาการแฝงที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่าที่มีผลต่อการแพร่กระจายโรคใบขาวในแหล่งต่างๆ กลุ่มนี้สามารถแสดงใบขาวได้หากมีเชื้อมากในระดับรอยต่อระหว่างใบเขียวและขาวเขียวเมื่อมีภาวะเครียดมากระตุ้นดังกล่าวมาแล้ว จากการศึกษาพบว่าอ้อยที่เพาะจากลำยอดขาว ต้นอ่อนที่งอกจากโคนจนถึงกลางลำ จะมีอาการใบขาวระดับมากไปน้อย ส่วนต้นที่งอกจากข้อที่สูงขึ้นไปนั้นยังมีใบสีเขียว การตรวจด้วย 16S-23S rDNA พบดีเอ็นเอขนาด 700 bp ระดับ 1+ ถึง 4+ ในกลุ่มต้นอ่อนที่เป็นใบขาวและใบเขียวที่อยู่ใกล้กัน และพบดีเอ็นเอขนาด 210 bp ระดับ 4+ ทุกต้นของทั้งลำ (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2554) สาเหตุเพราะเชื้อไฟโตพลาสมาจะมีการสะสมมากที่บริเวณโคนต้น เมื่อนำกลุ่มต้นใบเขียวเหล่านี้มาทดสอบด้วยภาวะเครียดจากแล้งและขาดน้ำดังกล่าวพบว่ากลุ่มใบเขียวระหว่างช่วงต่อนี้จะแสดงใบขาว ส่วนกลุ่มใบเขียวส่วนบนจะยังไม่มีอาการใบขาวให้เห็น ดังนั้นในกลุ่มใบเขียวที่ไม่มีอาการนี้ จึงสามารถแยกได้ปีน 3 กลุ่มใหญ่ คือ 1) กลุ่มที่มีเชื้อสูงที่ไม่ควรนำไปใช้ขยายพันธุ์ต่อเพราะถูกกระตุ้นให้แสดงใบขาวได้ทันทีด้วยภาวะเครียด เป็นกลุ่มที่อยู่ช่วงรอยต่อระหว่างใบขาวและเขียว ตรวจพบ 700 bp และ secA ประมาณ 1-2+ และ 210 bp ระดับ 4+ หรือมีเชื้อประมาณ 10-100 copies/µl 2) กลุ่มเฝ้าระวังมีเชื้อต่ำกว่ากลุ่มแรก ตรวจพบเฉพาะ 210 bp

ระดับ 2-4+ หรือมีเชื้อประมาณ 1-น้อยกว่า 1copies/µlได้แก่ กลุ่มใบเขียวส่วนบนของลำยอดขาว ซึ่งมีโอกาสเกิดใบขาวได้หากมีช่วงเวลาสะสมปริมาณเชื้อให้มากพอ และอ้อยเกิดอ่อนแอลงจากภาวะเครียด 3) กลุ่มปลอดภัย มาจากลำ กอและแปลงที่สะอาด ไม่มีอาการใบขาว หรือจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถนำไปขยายพันธุ์ได้ กลุ่มนี้มีเชื้อปริมาณต่ำมากน้อยกว่า 1 copies/µl แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยแรกพบเฉพาะ 210 bp ระดับ 1+ หรือน้อยกว่า กลุ่มย่อยที่ 2 ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อเลย เนื่องจากความสำคัญอยู่ในกลุ่มใบเขียวที่มีเชื้อระดับต่างๆ ดังนั้นการแบ่งช่วงรหัสสีจึงให้ความสำคัญกับระดับปริมาณเชื้อที่ตรวจด้วยพีซีอาร์ และโอกาสในการเกิดอาการใบขาวมากกว่าระดับอาการใบขาว รหัสสีที่คัดเลือกมาใช้ในการรายงานผลประกอบด้วย กลุ่มที่มีเชื้อสูง กำหนดเป็นสีแดง ที่ไม่ควรนำไปใช้ขยายพันธุ์ต่อ กลุ่มเฝ้าระวัง กำหนดเป็นสีส้ม เป็นกลุ่มที่มีเชื้อต่ำกว่ากลุ่มสีแดงแต่อยู่ระหว่างสะสมเชื้อ และเกิดใบขาวได้ในรุ่นตอ 1 และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มปลอดภัย แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 1. กลุ่มสีเขียว ตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ อาจใช้ระยะเวลาในการสะสมเชื้อที่นานขึ้น อาจอยู่ได้ถึงตอ 2 หรือมากกว่าหากมีการดูแลรักษาแปลงที่ดี และ 2. กลุ่มสีขาว ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อในตัวอย่างที่ส่งตรวจ เป็นกลุ่มปลอดภัย สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้ นอกจากนี้ สีเหลือง ถูกนำมาใช้เพิ่มเติม ให้หมายถึงมีการตรวจพบเชื้ออื่น เพราะการตรวจ 16S-23S rDNA ด้วยวิธีนี้ สามารถพบดีเอ็นเอของแบคทีเรียอื่นได้ด้วย ซึ่งเป็นการนำข้อเสียของวิธีการมาใช้ประโยชน์ได้การรายละเอียดการกำหนดช่วงปริมาณเชื้อและรหัสสีแสดงในตารางที่1 ตัวอย่างการรายงานผลเฉพาะส่วนของการประเมินปริมาณเชื้อด้วยรหัสสี (Fig. 4) และตัวอย่างการรายงานผลที่มีทั้งการกำหนดรหัสสีและการตรวจชนิดของเชื้อ (Fig. 5)

การรายงานผลด้วยรหัสสีได้เริ่มนำมาทดสอบในกลุ่มตัวอย่างอ้อยที่ส่งตรวจในปี 2557 ช่วงอายุอ้อยประมาณ 5-7 เดือน จากการตรวจตัวอย่างอ้อยจากโครงการต้นแบบการจัดการโรคใบขาวจากศูนย์วิจัยและพัฒนาจังหวัดภายใต้ สวพ.3 และ 4 จำนวน 10 ศูนย์ ที่นำไปปลูกทั้งในศูนย์และในไร่เกษตรกร พบว่าส่วนใหญ่มีเชื้อระดับสีส้ม (Table 2) จากการติดตามผลอ้อยตอในปี 2558 พบว่าบางแปลงที่มีการสำรวจ เริ่มพบใบขาวแล้ว เช่น ลำดับที่ 1, 5 และ 11 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีสัดส่วนรหัสสีส้มสูง ในกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์รหัสสีเขียวสูงมากกว่าส้ม เช่น ลำดับที่ 13 เริ่มพบหน่อขาวในกอ ส่วนกลุ่มที่พบรหัสสีขาวสูง เช่น ลำดับที่ 8, 10 และ 12 ยังไม่พบใบขาว จะเห็นได้ว่าการรายงานผลด้วยรหัสสีนี้นอกจากทำให้การอ่านผลการตรวจง่ายขึ้นแล้วการคาดการณ์ยังสอดคล้องกับอุบัติการณ์ใบขาวที่เกิดขึ้น ทั้งนี้ในการประเมินระดับความรุนแรงของโรคในระดับแปลงนั้น ต้องมีจำนวนตัวอย่างมากพอในการเป็นตัวแทนของทั้งแปลง เช่น จำนวนตัวอย่างของศูนย์ลำดับที่ 9 มีจำนวนน้อยเกินไปไม่สามารถนำมาประเมินได้ การสุ่มเก็บตัวอย่างควรครอบคลุมสภาพดินของทั้งแปลง เพราะสภาพดินมีผลอย่างมากต่อความแข็งแรงของพืช ภายในแปลงเดียวกันมักพบว่ามีสภาพดินต่างกัน นอกจากนี้อ้อยเป็นพืชที่แตกกอ ดังนั้นจะต้องคัดเลือกลำที่ใช้ตัวแทนที่ดีของกอนั้นๆ เช่น อาจใช้ลำหลัก ที่เป็นแหล่งสะสมเชื้อหลัก และหน่อรุ่นหลังๆ ประกอบการตรวจด้วย จากการสำรวจพบว่าลำที่มียอดขาว

มักจะมีหน่อขาวด้วยเนื่องจากมีเชื้อสะสมมากที่โคน ส่วนลำที่ไม่มีอาการใบขาว อาจมีหน่อขาวได้ในหน่อรุ่นหลัง เพื่อให้ได้ผลการตรวจและการคาดการณ์การแสดงใบขาวที่แม่นยำ สามารถจัดการได้เหมาะสมมากขึ้น จากการดำเนินงานตรวจโรคที่ผ่านมา ยังไม่ให้ความสำคัญกับรายละเอียดนี้ จึงทำให้การดำเนินงานจัดการใบขาวไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

สรุปผลการทดลอง

ผลงานวิจัยที่นำเสนอนี้นับเป็นรายงานแรกในการพัฒนาวิธีการตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจเชื้อ วัดปริมาณเชื้อ จำแนกชนิดของเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยได้ มีการออกแบบวิธีการรายงานผล พร้อมคำอธิบายผล และคำแนะนำ เพื่อให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อได้ การพัฒนาวิธีการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างง่ายโดยใช้ Conventional PCRโดยตรวจที่ยีน 16S-23S rDNA ด้วยเทคนิค nested-PCR ซึ่งได้ผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 bp ที่ใช้เป็นตำแหน่งในการระบุปริมาณเชื้อมาก ที่สามารถก่อเกิดอาการใบขาวได้ และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 210 bp ที่ระบุถึงปริมาณเชื้อระดับที่ต่ำกว่านี้ การระบุปริมาณเชื้อของวิธีการนี้ ใช้การเทียบความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้จากการโคลนชิ้นของยีนเข้าสู่พลาสมิด ซึ่งจัดเป็น “เทคนิคกึ่งปริมาณ (Semi-Quantitative Analysis)” ความไม่จำเพาะของไพร์เมอร์ที่ใช้ทำให้ตรวจพบเชื้ออื่นได้ด้วย และถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบผลการตรวจด้วย การยืนยันผลการติดเชื้อโรคใบขาวใช้การตรวจด้วยไพร์เมอร์ที่ได้พัฒนาให้จำเพาะต่อยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย การใช้วิธี direct PCR ในการตรวจเพื่อลดการปนเปื้อน ทำให้มีข้อเสียคือมีความไวต่ำ ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจได้ด้วยวิธีการนี้จึงเทียบเท่ากับผลการตรวจด้วย 700 bp ที่ได้จากยีน 16S-23S rDNA การตรวจปริมาณเชื้อที่ได้ข้อมูลที่ละเอียดมากขึ้นใช้เทคนิค Realtime PCR ซึ่งได้พัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้ยีน *secA*โดยมีช่วงความเข้มข้นของเชื้อที่เชื่อมั่นได้อยู่ระหว่าง 10^{2}-10^{10}copies/µl (20 ng plant DNA) การจำแนกชนิดของเชื้อได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจความแตกต่างของลำดับเบสตำแหน่ง SNPs ที่สามารถแยกเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ โดยใช้เทคนิค HRM แทนการวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ได้ผลในเวลารวดเร็ว แม่นยำ และแปลผลง่าย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานด้านพาหะนำโรค หรือการติดเชื้อข้ามชนิด ในการรายงานผล ใช้รหัสสีที่สื่อความหมายที่ผู้ใช้เข้าใจได้ทันที ซึ่งพัฒนาจากการประมวลปริมาณเชื้อ ระดับความเครียดในอ้อย และโอกาสในการแสดงอาการใบขาว โดยกำหนดเป็น 4 สีที่สามารถแสดงถึงระดับอันตรายที่ไม่ควรนำไปขยายพันธุ์ต่อจนถึงระดับปลอดภัยที่ขยายพันธุ์ต่อได้ รวมถึงคาดการณ์การเกิดใบขาวในรุ่นต่อมา นอกจากนี้ยังมีการกำหนดสีที่หมายถึงการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย จากการติดตามผลการตรวจโรคใบขาวด้วยวิธีใหม่นี้ในตัวอย่างที่ส่งตรวจในปี 2557 พบว่าผลการตรวจและการคาดการณ์ด้วยรหัสสีสอดคล้องกับอุบัติการณ์ใบขาวในอ้อย

การนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้ได้มีการนำมาใช้ตรวจตัวอย่างอ้อยที่ส่งตรวจในปี 2557 แล้วประมาณ 1535 ตัวอย่างโดยกลุ่มเป้าหมายที่นำไปใช้ประโยชน์ เป็นนักวิจัยของกรมวิชาการเกษตรและจากหน่วยงานอื่น มีการนำไปใช้ในโครงการผลิตอ้อยสะอาดเพื่อปลูกทดแทนพื้นที่ปลูกข้าวที่ไม่เหมาะสม โครงการความร่วมมือระหว่างหน่วยงานภาครัฐและเอกชนในการกำจัดโรคใบขาว โครงการแปลงต้นแบบสำหรับขยายพันธุ์อ้อยสะอาดของ สวพ.3 โครงการวิจัยร่วมระหว่าง JIRCAS และศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น เพื่องานปรับปรุงพันธุ์อ้อย และการวิจัยด้านโรคใบขาวในเขตภาคอีสาน งานวิจัยจากหน่วยงานอื่นนอกกรมวิชาการเกษตร มีการเผยแพร่ผลงานในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีการใหม่ในการประชุมนำเสนอผลงานประจำปีของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น งานประชุม TSP 2012 ที่จังหวัดเชียงใหม่ งานประชุมแถลงผลงานวิจัยร่วมระหว่างศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นและ JIRCAS งานประชุม ISSCT Congress ที่ประเทศบราซิลปี 2556 งานประชุมอ้อยแห่งชาติ ปี 2554 ที่สุพรรณบุรี และ 2555 ที่ขอนแก่น มีการถ่ายทอดวิธีการตรวจโรค และแลกเปลี่ยนข้อมูลกับนักวิจัยจากYunnan Sugarcane Research Instituteประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน และตีพิมพ์ผลงานร่วมกับนักวิจัยจาก 2 สถาบัน ได้แก่ Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth ประเทศเยอรมันนีและ Department of Plant Biology, University of Aleppo ประเทศซีเรีย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย ขอบคุณนักวิจัยจากหน่วยงานเครือข่าย สวพ. 3 และ 4 จำนวน 10 แห่ง ที่ร่วมในโครงการขยายพันธุ์อ้อยสะอาด ที่ดำเนินการสำรวจและส่งตัวอย่างมาวิเคราะห์ ขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ นฤทัย วรสถิตย์ ที่ดำเนินงานโครงการแปลงต้นแบบเพื่อขยายพันธุ์สะอาด คณะนักวิจัยจากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นและสถาบันวิจัยพืชไร่ฯ ที่ส่งตัวอย่างมาเพื่อวิเคราะห์ Mr. Ando Shataro, Dr. Tsuruta Shinichi และ Mr. Yoshifumi Terajima นักวิจัยจาก JIRCAS ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในส่วนที่เกี่ยวข้อง ขอขอบคุณ คุณดารารัตน์ มณีจันทร์ จากสถาบันวิจัยพืชไร่ฯ ที่ช่วยเหลือด้านเอกสาร และที่สำคัญขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ช่วยให้งานวิจัยดำเนินการได้และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ ศุภกาญจน์ ล้วนมณี ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และเกษม ชูสอน. 2554. ปัจจัยทางการเกษตรที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวของอ้อย. หน้า 63-68. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ ธงชัย ตั้งเปรมศรี ศุภกาญจน์ ล้วนมณี ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วันทนา ตั้งเปรมศรี นิลุบล ทวีกุล ทักษิณา สันสยะวิชัย และเกษม ชูสอน. 2553. การจัดการสมดุลธาตุอาหารพืชเพื่อความทนทานของอ้อยที่มีต่อโรคใบขาวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. รายงานผลงานวิจัยปี 2553 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร หน้า 295-303.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบาง .2557 . 1.เอกสารรายงาน ตป .ชนิดในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวรอบ .2557 เดือน ประจำปี 12กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูงผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการ .2556 . .2555 เกษตร ประจำปีกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ .15-1 หน้า .

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ปิยะดา ธีรกุลพิสุทธิ์ ทักษิณา ศันสยะวิชัยสุนี ศรีสิงห์ นิลุบล ทวีกุล นฤทัย วรสถิตย์ และรังสี เจริญสถาพร. 2554. วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. หน้า 74-80. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ สุนี ศรีสิงห์ และ ปิยะดา ธีรกุล พิสุทธิ์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. ว. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 231-240.

Ahrens U. and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82**:** 828-832.

Aldaghi, M., S. Massart, S. Roussel and M.H. Jijakli. 2006. Establishment of a New Method for Rapid and Precise Estimation of Apple Proliferation Phytoplasma Concentration in Periwinkle. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University, 71/3a, pp. 853-857.

Areekit, S., P. Kanjanavas, A. Pakpitchareon, P.Khawsak, S. Khuchareontaworn, T. Sriyaphai, K. Chansiri. 2009. High resolution melting real-time PCR for rapid discrimination between *Brugia malayi* and *Brugia Pahangi.* J. Med Assoc Thai Vol. 92 Suppl. 3.

Bekele, B., Abeysinghe, S., Hoat,T. X., Hodgettes, J., Dickinson, M. 2011. Development of specific secA-based diagnostics for the 16SrXI and 16SrXIV phytoplasmas of the Gramineae.*Bulletin* of Insectology 64 (Supplement): S15-S16, 2011

Berges, R. M. Rott, E. Seemüller. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. Phytopath. 90. pp. 1145–1152

Deng S., C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. J. Microbiol. Methods. 14: 53-61.

Hanboonsong, Y., W. Ritthison, and C. Choosai, 2005. Molecular detection and transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in leafhopper. KKU Res. J. 10(1): 13-21.

Harrison, N.A., M. Womack, and M.I. Carpio. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texus. Plant Disease. 86, 676-681.

Harrison, N.A., M. Womack, and M.I. Carpio. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texus. Plant Disease. 86, 676-681.

I.-M Lee, R.W Hammond, R.E Davis, D.E Gundersen. 1993. Universal ampilification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopath. 83. pp. 834–842

Jarausch, W., T. Peccerella, N. Schwind, B. Jaruusch and G. Krczal. 2004. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. Acta Hort., **657**:415-420.

Jones,D. P. 2006. Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal 8: 1865–1879.

Li, M. and D.J., Midmore..1999Estimating the genetic relationships of chinese water chestnut (E. dulcis Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPD.J.of Hort. and Biotec..231-224 :(2)74

Martini, M., P. Ermacora, G. Magris, F.Ferrini and N. Loi. 2011. Symptom expression and '*Candidatus* Phytoplasma prunorum' concentration in different *Prunus* species. Bulletin of Insectology 64 (Supplement): S171-S172.

Matsumoto, T., C. S. Lee, and W. S. Teng. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special reference to transmission by a leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. Proc. Soc. Sugarcane Technol. 13: 1090-1099.

Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H-Y. Jung. W. Wei. S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki, and S. Namba. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathigenic phytoplasma. Nature Genetics. 36, 27-29.

Sakuanrungsirikul, S., T. Wongwarat, S. Sankot, K. Kawabe, Y. Kobori and S. Ando. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and their detection methods. Proc. Int. Soc. Sugar cane technol., Vol 28, 2013.

Sánchez-Rojo, S., López-Delgado, H.A., Mora-Herrera, M.E., Almeyda-León, H.I., Zavaleta-Mancera, H.A., Espinosa-Victoria, D. 2010. Salicylic Acid Protects Potato Plants-from Phytoplasma-associated Stress and Improves Tuber Photosynthate Assimilation. Am. J. Pot Res. DOI 10.1007/s12230-010-9175-y.

Soufi, Z. 2012. Molecular detection and identification of phytoplasmas in sugarcane in Hawaii, Thailand, Cuba and Near East.Ph.D.Dissertation. Bayreuth, Germany.

Srivastava, S., V. Singh, P.S. Gupta, O.K. Sinha, and A. Baitha. 2006. Nested PCR assay for detection of sugarcane grassy shoot phytoplasma in the leafhopper vector *Deltocephalus vulgaris*: a first report. Plant Pathol. 55: 25-28.

Torres, E., E. Bertolinie, M. Cambra, C. Monton, and M.P. Martin. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from appleproliferation (16SrX) group. Mol. Cell. Probes, **19**:334-340.

Weintraub, P.G., and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology, 51: 91-111.

Whelan, J.A., N.B. Russel, M.A. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. J. Immunol. Methods 278: 261-269.

Wongwarat, T., S. Sakuanrungsirikul and P. Theerakulpisut. (2011). Effective method of preserving SCWL-diseased sugarcane leaves for genomic DNA extraction and molecular detection of phytoplasma. Afr. J. Biotechnol. 10(53):10871-10876.

Zhao, Y., W. Wei, R.E. Davis, and I.M. Lee. 2010. Recent advances in 16SrRNA Gene-based Phytoplasma Differentiation, Classification and Taxonomy. In : Phytoplasma: Genomes, Plant Hosts and Vectors. P.G. Weintraub and P. Jones (eds.). CABI, UK. 329 p.

Zianni, M.R., M.R. Nikbakhtzadeh, B. T. Jackson, J. Panescu and W. A. Foster. 2013. Rapid discrimination between Anopheles gambiae s.s. and Anopheles arabiensis by high-Resolution melt (HRM) analysis. J. of Biomol.Tech. 24:1–7.

Table 1 Comparison of sugarcane white leaf phytoplasma concentration estimated by three different approaches including absolute quantification Real time PCR (RT-PCR) of secA gene, banding intensity levels generated by conventional PCR at 16S-23S rDNA and at secA gene and color code ranges. Not detected: out of acceptable range. * Leaf from 3 individual samples collected from different source. ** Concentration in 25 ng plant DNA.

Leaf symptom*	Detection techniques					Color code
	RT-PCR-secA	Conventional PCR DNA banding intensity				
	Concentration range (copies/µl)**	Plasmid Concentration (copies/µl)**	16S-23S rDNA		secA (277 bp)	
			700 bp	210 bp		
Fully White	$1.54x10^5$- $7.91 x10^5$	10^5	4+	4+	4+	red
Partial white	$1.2x10^3$ - $1.74x10^4$	10^4	4+	4+	3+ to 4+	red
		10^3	3+	4+	2+ to 3+	red
green	No detected	10^2	2+	4+	<2+	red
green	No detected	10^1	1+	4+	< 1+	red
green	No detected	1	0	4+	0	orange
green	No detected	<1	0	2+ to 3+	0	orange
green	No detected	<1	0	1+	0	green
green	No detected	<1	0	0	0	white

Table 2 Estimation of sugarcane white leaf phytoplasma concentrations indicate by color codes in sugarcane leaf samples collected from different planting fields. Red and orange indicate high concentration. Green and white indicate low concentration. Yellow indicates multiple infections.

RDC: Research and Development Center, RC: Research Center. NS: no survey

Sender	amount	Phytolasma Concentration (Sample percentage)					White leaf in ratoon by visual observation
		red	orange	green	white	yellow	
1.RDC. Kalasin	24	0.0	66.0	34.0	0.0	16.0	Some emerged in plant cane
2.RDC. Khon Kaen	10	0.0	70.0	0.0	30.0	90.0	NS
3. RDC. Chaiyaphum	14	0.0	100.0	0.0	0.0	43.0	NS
4.RDC. Nakorn ratchasima	16	0.0	87.5	12.5	0.0	0.0	NS
5.RDC. Nonsong (1)	74	5.4	56.8	16.2	24.3	45.9	Ratoon 2: white
6. RDC. Nonsong (2)	32	0.0	21.9	0.0	78.1	0.0	NS
7.RDC. Mukdahan	22	31.8	68.2	0.0	0.0	22.7	NS
8.RDC. Roi et	7	0.0	14.3	14.3	71.4	28.6	none
9.RDC. Sakon nakorn	2	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	None/ irrigate
10.RDC. Makasarakham	22	0.0	27.2	4.5	68.1	13.6	White 0.01% app
11.RDC. Udonthani	17	0.0	76.5	0.0	23.5	100.0	White over 50%
12.RC. Khon Kaen (Chayan)	22	0.0	4.5	4.5	90.9	0.0	None
13.RC. Khon Kaen (Pakphum1)	10	0.0	30.0	70.0	0.0	0.0	White shoot 1%
14. RC. Khon Kaen (Pakphum2)	10	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	NS
15. RC. Khon Kaen (Pakphum3)	16	0.0	12.5	0.0	87.5	0.0	NS

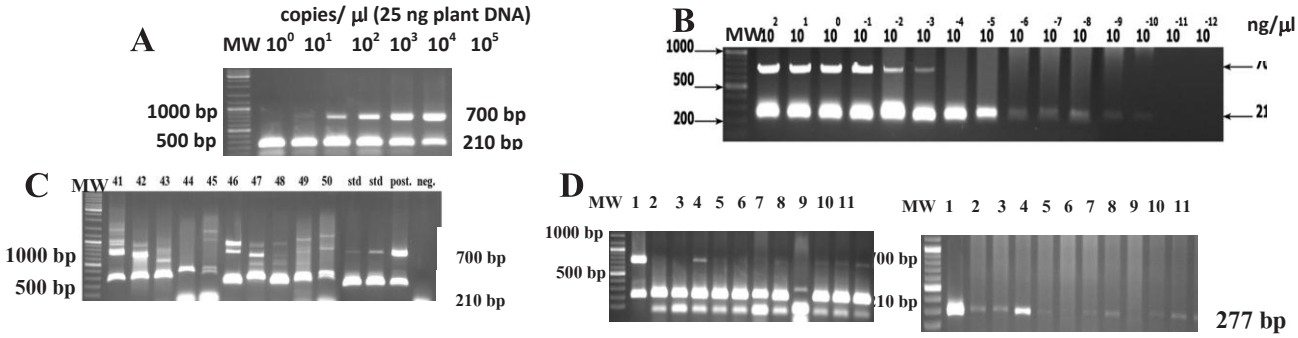


Figure 1 Nested-PCR amplification of sugarcane white leaf phytoplasma using primers targeted 16S-23S rDNA gene by nested-PCR with first set PCR product of 700 bp and second set product of 210 bp. A. PCR products of different plasmid concentrations containing 700 bp fragments ranging from 10^0-10^{10} copies/µl (25 ng plant DNA). B. Banding intensities of 700 bp and 210 bp amplified from serial dilution of DNA extracted from white leaf samples. C. Banding patterns obtained from DNA extracted from field samples with multiple infections. D. Banding results obtained from samples amplified by 16S-23S rDNA Nested-PCR amplification (left) and secA (right) showing banding intensities of corresponding samples.

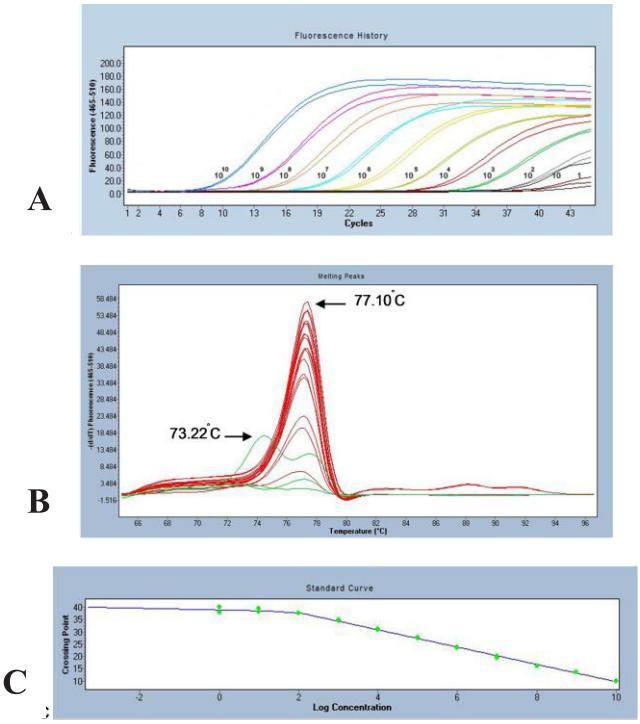


Figure 2 Amplification curves obtained from realtime PCR detection of different concentration of plasmid containing *secA* gene fragment. **A**. Curves showing threshold cycle (Ct) of amplification plasmid pUC1318-secA with 1-10^{10}copies/µl (25 ng plant DNA). **B.** Curves showing melting temperature (Tm) peak of target DNA at 77.10 °C. **C**. Standard curve generated from Ct and $\log_{10}$pUC1318-secA concentration ranging from 1-10^{10}copies/µl (25 ng plant DNA)

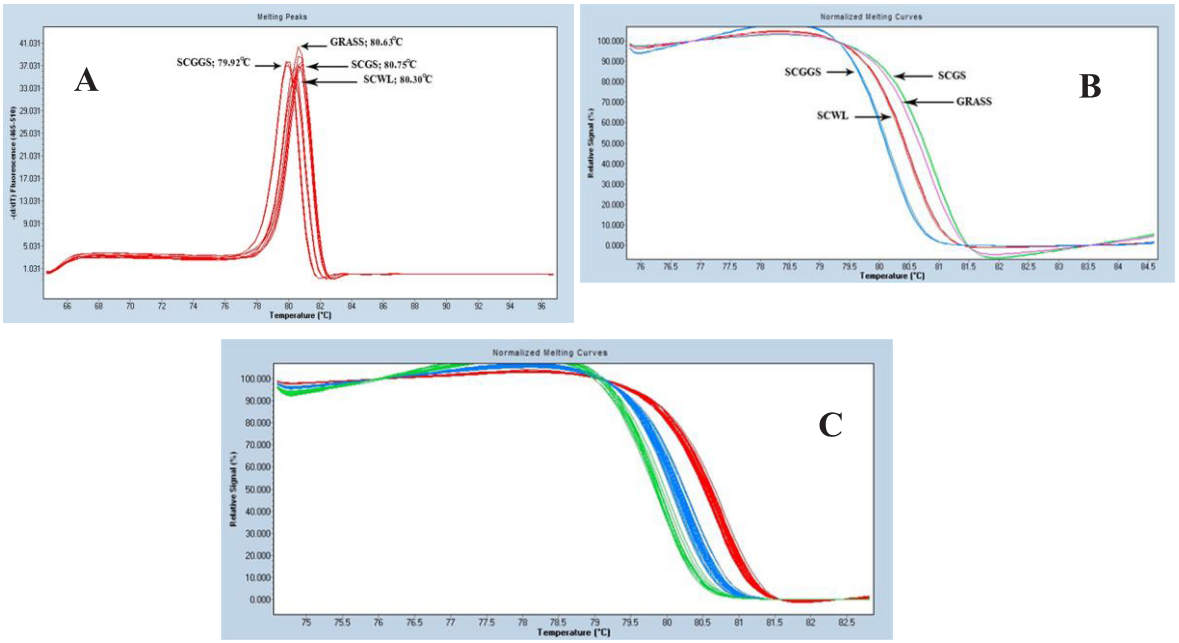
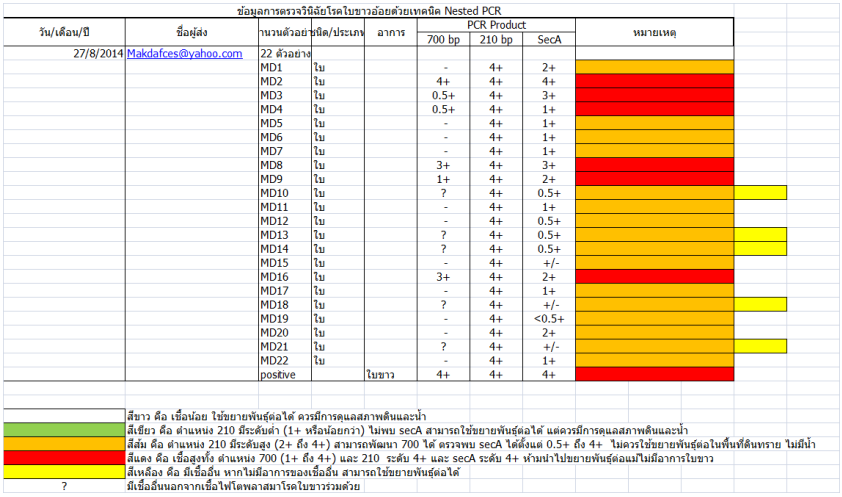


Figure 3 Gene typing of 3 different sugarcane phytoplasmas. (A) Melting peak (Tm) of 75 bp PCR products obtained from SCWL, SCGS, SCGGS and grass with white leaf showing different Tm. (B) Normalized melting curves showing segregration patterns of PCR products amplified from SCWL, SCGS, SCGGS and grass with white leaf. (C) Normalized melting curves showing segregation patterns of PCR products amplified from 15 SCWL samples, 19 SCGS and 4 SCGGS samples. Red, green and blue represent melting curves of SCWL, SCGS and SCGGS respectively.

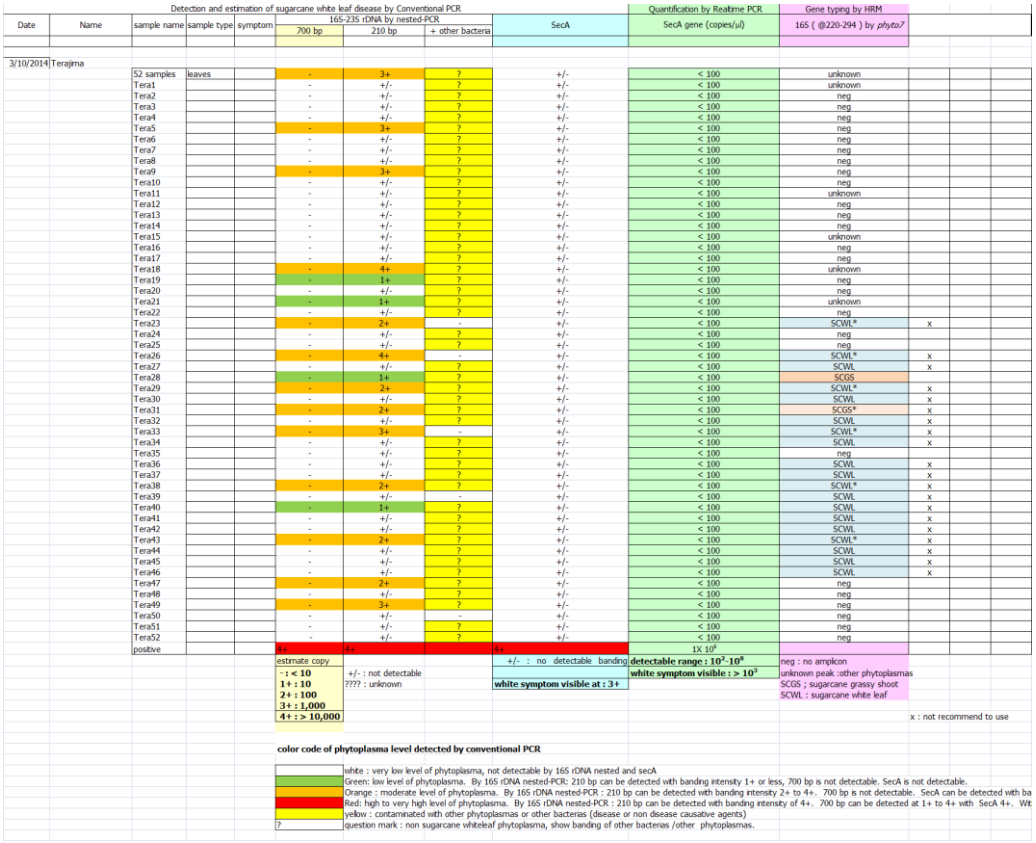


ข้อมูลการตรวจวินิจัยโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Nested PCR

วัน/เดือน/ปี	ชื่อผู้ส่ง	จำนวนตัวอย่าง/ชนิด/ประเภ	อาการ	PCR Product 700 bp	PCR Product 210 bp	PCR Product SecA	หมายเหตุ
27/8/2014	Makdafces@yahoo.com	22 ตัวอย่าง					
		MD1 ใบ		-	4+	2+	
		MD2 ใบ		4+	4+	4+	
		MD3 ใบ		0.5+	4+	3+	
		MD4 ใบ		0.5+	4+	1+	
		MD5 ใบ		-	4+	1+	
		MD6 ใบ		-	4+	1+	
		MD7 ใบ		-	4+	1+	
		MD8 ใบ		3+	4+	3+	
		MD9 ใบ		1+	4+	2+	
		MD10 ใบ		?	4+	0.5+	
		MD11 ใบ		-	4+	1+	
		MD12 ใบ		-	4+	0.5+	
		MD13 ใบ		?	4+	0.5+	
		MD14 ใบ		?	4+	0.5+	
		MD15 ใบ		-	4+	+/-	
		MD16 ใบ		3+	4+	2+	
		MD17 ใบ		-	4+	1+	
		MD18 ใบ		?	4+	+/-	
		MD19 ใบ		-	4+	<0.5+	
		MD20 ใบ		-	4+	2+	
		MD21 ใบ		?	4+	+/-	
		MD22 ใบ		-	4+	1+	
		positive	ใบขาว	4+	4+	4+	

	สีขาว คือ เชื้อน้อย ใช้ขยายพันธุ์ต่อได้ ควรมีการดูแลสภาพต้นและน้ำ
	สีเขียว คือ ตำแหน่ง 210 มีระดับต่ำ (1+ หรือน้อยกว่า) ไม่พบ secA สามารถใช้ขยายพันธุ์ต่อได้ แต่ควรมีการดูแลสภาพดินและน้ำ
	สีส้ม คือ ตำแหน่ง 210 มีระดับสูง (2+ ถึง 4+) สามารถพัฒนา 700 ได้ ตรวจพบ secA ได้ตั้งแต่ 0.5+ ถึง 4+ ไม่ควรใช้ขยายพันธุ์ต่อในพื้นที่ดินทราย ไม่มีน้ำ
	สีแดง คือ เชื้อสูงทั้ง ตำแหน่ง 700 (1+ ถึง 4+) และ 210 ระดับ 4+ และ secA ระดับ 4+ ห้ามนำไปขยายพันธุ์ต่อแม้ไม่มีอาการใบขาว
	สีเหลือง คือ มีเชื้ออื่น หากไม่มีอาการของเชื้ออื่น สามารถใช้ขยายพันธุ์ต่อได้
?	มีเชื้ออื่นนอกจากเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวร่วมด้วย

Figure 4 Example of a phytoplasma detection and diagnosis report sheet partial scale. Features includes sender's name, date, sample number, result of 700 bp and 210 bp from 16S-23S gene, 277 bp from *secA* illustrating in scale <1-4+. Color codes represent diagnosis assimilates from detection results.



Detection and estimation of sugarcane white leaf disease by Conventional PCR

Date	Name	sample name	sample type	symptom	16S-23S rDNA by nested-PCR 700 bp	16S-23S rDNA by nested-PCR 210 bp	+ other bacteria	SecA	Quantification by Realtime PCR SecA gene (copies/µl)	Gene typing by HRM 16S (@220-294) by *phyto7*			
3/10/2014	Terajima												
		52 samples	leaves		-	3+	?	+/-	< 100	unknown			
		Tera1			-	+/-	?	+/-	< 100	unknown			
		Tera2			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera3			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera4			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera5			-	3+	?	+/-	< 100	neg			
		Tera6			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera7			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera8			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera9			-	3+	?	+/-	< 100	neg			
		Tera10			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera11			-	+/-	?	+/-	< 100	unknown			
		Tera12			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera13			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera14			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera15			-	+/-	?	+/-	< 100	unknown			
		Tera16			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera17			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera18			-	4+	?	+/-	< 100	unknown			
		Tera19			-	1+	?	+/-	< 100	neg			
		Tera20			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera21			-	1+	?	+/-	< 100	unknown			
		Tera22			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera23			-	2+	-	+/-	< 100	SCWL*	x		
		Tera24			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera25			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera26			-	4+	-	+/-	< 100	SCWL*	x		
		Tera27			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera28			-	1+	?	+/-	< 100	SCGS			
		Tera29			-	2+	?	+/-	< 100	SCWL*	x		
		Tera30			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera31			-	2+	?	+/-	< 100	SCGS*	x		
		Tera32			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera33			-	3+	-	+/-	< 100	SCWL*	x		
		Tera34			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera35			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera36			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera37			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera38			-	2+	?	+/-	< 100	SCWL*	x		
		Tera39			-	+/-	-	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera40			-	1+	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera41			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera42			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera43			-	2+	?	+/-	< 100	SCWL*	x		
		Tera44			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera45			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera46			-	+/-	?	+/-	< 100	SCWL	x		
		Tera47			-	2+	?	+/-	< 100	neg			
		Tera48			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera49			-	3+	?	+/-	< 100	neg			
		Tera50			-	+/-	-	+/-	< 100	neg			
		Tera51			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		Tera52			-	+/-	?	+/-	< 100	neg			
		positive			4+	4+		4+	1X 10^6				

estimate copy

- : < 10
1+ : 10
2+ : 100
3+ : 1,000
4+ : > 10,000

+/- : not detectable
???? : unknown

+/- : no detectable banding

white symptom visible at : 3+

detectable range : 10^2-10^8

white symptom visible : > 10^3

neg : no amplicon
unknown peak :other phytoplasmas
SCGS ; sugarcane grassy shoot
SCWL : sugarcane white leaf

x : not recommend to use

color code of phytoplasma level detected by conventional PCR

	white : very low level of phytoplasma, not detectable by 16S rDNA nested and secA
	Green: low level of phytoplasma. By 16S rDNA nested-PCR: 210 bp can be detected with banding intensity 1+ or less, 700 bp is not detectable. SecA is not detectable.
	Orange : moderate level of phytoplasma. By 16S rDNA nested-PCR : 210 bp can be detected with banding intensity 2+ to 4+. 700 bp is not detectable. SecA can be detected with ba
	Red: high to very high level of phytoplasma. By 16S rDNA nested-PCR : 210 bp can be detected with banding intensity of 4+. 700 bp can be detected at 1+ to 4+ with SecA 4+. Wit
	yellow : contaminated with other phytoplasmas or other bacterias (disease or non disease causative agents)
?	question mark : non sugarcane whiteleaf phytoplasma, show banding of other bacterias /other phytoplasmas.

Figure 5 Example of a phytoplasma detection and diagnosis report sheet full scale. Features includes sender's name, date, sample number, result of 700 bp and 210 bp from 16S-23S gene, 277 bp from *secA* , realtime PCR quantification of *secA* fragment and gene typing by HRM. Color codes represent diagnosis assimilates from detection results.

การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหา แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

Using Real time PCR Technique for the Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Causal Agent of Citrus Canker for Certification of Canker Free Orchards

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล [1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ [1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ [1/]
รุ่งนภา ทองเครั่ง [1/] บุญปิยะธิดา คล่องแคล่ว [2/]
Nuttima Kositcharoenkul [1/] Tippawan Kanhayart [1/] Buranee Puawongphat [1/]
Rungnapha Thong kreng [1/] Boonpiyatida Klongklew [2/]

ABSTRACT

To export pomelo (*Citrus maxima* Merr.) to the European Union (EU) Thailand is obliged to follow the International Standards for Phytosanitary Measures No. 6 (ISPM No. 6) the Guidance for Surveillance and the ISPM No.10 Guidelines for Surveillance Requirements for the Establishment of Pest Free Places of Production and Pest Free Production Sites. Canker disease of pomelo caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* is a quarantine pest of the EU. Therefore, in Thailand Pomelo orchards certification for canker free is necessary and the effective detection method for *X. axonopodis* pv. *citri* needs to be developed. This work was to utilize the Real time PCR, the rapid and high accuracy technique, to detect *X. axonopodis* pv. *citri* for the canker-free certification of pomelo orchards. The primers 2/3 and D1/D2 were designs from avirulence/ pathogenicity gene (pthA gene) of *X. axonopodis* pv. *citri* which had high specificity and could detect as minimum as 5 picrograms of DNA or 81 cfu/mL the bacterial cells. The method showed high accuracy of detection of *X. axonopodis* pv. *citri* in both symptom and symptomless samples. In 2014, this Real time PCR method was used for the establishment of canker-free places of production and canker-free production sites at pomelo orchards at Wiang Kaen Districts, Chiang Rai Province. From 130 orchards, 84 canker-free production orchards were successfully established. The Real time PCR method developed in this study was eventually accepted by the EU for the pomelo

[1] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture
[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงจังหวัดเชียงราย
Cheng Rai Agriculture Research and Development Center

production in Thailand for export to the EU and representing as a model for the canker-free certification of others crops for countries where *X. axonopodis* pv. *citri* is a quarantine pests

Key-words : Real time PCR, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* , Canker, Citrus

บทคัดย่อ

จากการที่ประเทศไทยสามารถส่งออกส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ไปยังสหภาพยุโรป โดยต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืชฉบับที่ 6 (ISPM NO. 6) เรื่อง การเฝ้าระวังศัตรูพืช และฉบับที่ 10 (ISPM NO. 10) เรื่อง ข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช และต้องมีการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูก จึงจะสามารถส่งผลส้มโอไปยังสหภาพยุโรปได้ ซึ่งการตรวจรับรองแปลงปลูกจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ ที่มีประสิทธิภาพ การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อนำวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Real time PCR ที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง มาใช้ตรวจรับรองแปลงปลูกส้มโอปลอดจากโรคแคงเคอร์ โดยเทคนิค Real time PCR ใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity (pthA gene) มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* มีความไว (sensitivity) ในการตรวจแบคทีเรียที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA เท่ากับ 5 พิโคกรัม และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร วิธีการนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้อย่างแม่นยำทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ชัดเจนและตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ จากการนำวิธีการดังกล่าว ไปใช้ตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรป โดยดำเนินการในปี 2557 ที่แปลงปลูกส้มโอที่ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 103 แปลง ผลการตรวจรับรองพบว่าการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* อย่างแม่นยำ ทำให้สามารถตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ทั้งหมด 84 แปลง ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรป และวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

คำหลัก : เทคนิค Real time PCR แบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* แคงเคอร์ ส้มโอ

คำนำ

ส้มโอ [*Citrus maxima* (Burn) Merr.] เป็นผลไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่มีศักยภาพมากในการส่งออกเนื่องจากมีพันธุ์ดีตรงความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ นโยบายที่สำคัญของการส่งออกส้มโอไปขายต่างประเทศของประเทศไทย มุ่งเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตส้มโอคุณภาพ เพื่อให้เป็นผู้นำในการผลิตและการตลาดส้มโอคุณภาพดีในตลาดโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) แต่ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการส่งออกส้มโอของประเทศไทย คือ ปัญหาเรื่องโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคแคงเคอร์เป็นโรคที่สำคัญของพืชตระกูลส้มที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับแหล่งปลูกพืชตระกูลส้ม (Civerolo, 1984; Schubert and Miller, 1999) โรคแคงเคอร์เป็นโรคที่สำคัญทางกักกันพืชของหลายประเทศ เชื้อสาเหตุโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Syn. *Xanthomonas campestris* pv. *citri*) ในหลายประเทศ เช่น อเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่นและออสเตรเลีย โดยเฉพาะสหภาพยุโรป เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นศัตรูพืชกักกันที่ร้ายแรง (EPPO/CABI, 2005) การนำเข้าพืชตระกูลส้ม จึงมีกฎหมายและระเบียบควบคุมการนำเข้าอย่างเข้มงวด สหภาพยุโรปเป็นตลาดใหญ่แห่งหนึ่งของโลกมีความต้องการนำเข้าส้มโอมีกฎระเบียบที่เข้มงวดต้องปฏิบัติตามข้อกำหนดและเงื่อนไขการนำเข้าผลส้มโอของสหภาพยุโรปตาม Council Directive 2000/29/EU โดยต้องมีการรับรองอย่างเป็นทางการว่า ไม่พบโรคแคงเคอร์ที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* ทุกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคกับพืชตระกูลส้ม ในแปลงผลิตและพื้นที่ติดต่อใกล้เคียงตั้งแต่เริ่มฤดูกาลผลิตที่แล้วจนถึงฤดูกาลผลิตปัจจุบัน ผลส้มที่เก็บเกี่ยวจากแปลงผลิตต้องไม่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ ผลส้มก่อนส่งออกต้องชุบด้วยสาร sodium orthophenylphenates หรือสารอื่นที่เป็นที่ยอมรับ ต้องแสดงไว้ในใบรับรองตามเงื่อนไข และผลส้มบรรจุกล่องในสถานที่หรือศูนย์การขนส่งที่ลงทะเบียนเพื่อใช้ในการนี้โดยเฉพาะ หรือผ่านระบบที่ยอมรับได้ว่าเท่าเทียมกันกับเงื่อนไขที่ได้กำหนดไว้

จากการสำรวจและติดตามการเกิดโรคแคงเคอร์ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่าแหล่งปลูกส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จ.เชียงราย เป็นแหล่งปลูกส้มโอขนาดใหญ่ ไม่พบการระบาดของโรคแคงเคอร์บนพันธุ์ทองดี ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีรสชาดเป็นที่ต้องการของตลาดยุโรป จึงได้ดำเนินตรวจเพื่อการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ตามข้อกำหนดของสหภาพยุโรป โดยปฏิบัติตามข้อกำหนดของมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (International Standards for Phytosanitary Measures; ISPM) ฉบับที่ 6 (ISPM NO. 6) เรื่อง การเฝ้าระวังและติดตามศัตรูพืช และฉบับที่ 10 (ISPM NO. 10) เรื่อง ข้อกำหนดในการจัดตั้งแหล่งผลิตและแปลงผลิตปลอดศัตรูพืช โดยพัฒนาระบบการตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคที่เป็นที่ยอมรับของประเทศผู้นำเข้า ต้องมีการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอ มีการติดตามเฝ้าระวังการเกิดโรคในแหล่งผลิตเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูก ทำให้ประเทศไทยจะสามารถส่งออกส้มโอไป

จำหน่ายยังสหภาพยุโรปได้ โดยมีการระบุข้อความเพิ่มเติมในใบรับรองปลอดศัตรูพืช “Pomelo in this consignment has been inspected and treated under control of DOA Thailand according to EU 2000/29/EC annex 4A1 articles 16.2 c1, 16.3 A, 16.4 A, 16.5 C" ซึ่งหัวใจสำคัญของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบรับรองแปลงปลูกพืชให้เป็นที่ยอมรับของประเทศนำเข้า และการเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต คือวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ที่ถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่มีความเฉพาะเจาะจง ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและสามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยในตัวอย่างพืชได้ และมีรายงานการใช้เทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* (Hartung *et.al*., 1993, Hartung *et.al*., 1996, ณัฏฐิมา และคณะ, 2548) จึงมีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิตส้มโอเพื่อตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์และเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต แต่เนื่องจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR จะวิเคราะห์เมื่อสิ้นสุดขบวนการ PCR โดยต้องนำผลผลิต PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel eletrophoresis แล้วย้อมด้วยสาร ethediumbromide และตรวจภายใต้แสง UV ซึ่งไม่สามารถวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR และ สาร ethediumbromide เป็นสารก่อมะเร็งที่มีอันตราย Mavrodieva และคณะ (2004) ได้มีพัฒนาเทคนิค Real time PCR ในการตรวจสอบโรคแคงเคอร์ ที่มีความไว รวดเร็ว และวิเคราะห์ตามเวลาจริงที่เกิดขึ้นในหลอด PCR โดยสามารถตรวจสอบใบส้มที่เป็นโรคเพียงจุดแผลเล็กๆแผลเดียว โดยมีความไวในการตรวจจับความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* 10 CFU/แผล และเป็นการรายงานผลครั้งแรกในการใช้วิธีนี้ไปตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis pv. citri* บนตัวอย่างแห้งโรคพืช ที่เก็บไว้ตั้งแต่ ปี 1912 ในพิพิธภัณฑ์โรคพืช

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำเอาเทคนิค Real time PCR ซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง มีความปลอดภัยสูง ไม่ต้องใช้สารที่เป็นอันตราย สามารถแสดงผลได้ในเวลาอันรวดเร็ว ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิตส้มโอเพื่อตรวจสอบรับรองแหล่งผลิตปลอดโรคแคงเคอร์และเฝ้าระวัง ติดตามโรคแคงเคอร์ในแปลงผลิต

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง LightCycler® 480

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

4. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ, เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ, LightCycler 480 SYBR green I master, LightCycler 480 Mutiwell plate 96

5. แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชกลุ่ม *Xanthomonas* spp.และแบคทีเรียอื่นๆ

วิธีการ

การเตรียม DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

ทำการเตรียม DNA โดยการแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้ม อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลายใน 1 ul ของ Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) จำนวน 100 ul ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ul ของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ul ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 ^{o}C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) จำนวน 500 ul ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 ^{o}C จำนวน 378 ul ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอน DNA ด้วย 150 ul ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ul วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ให้ได้ 50, 5, 0.5 ng/ul และ 5, 0.5, 0.05 , 0.005 pg/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR

การเตรียมสารละลายเชื้อ (cell suspension) ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

นำแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เลี้ยงในอาหาร LB medium ให้มีอายุ 48 ชั่วโมง นำมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ วัดความขุ่นของสารละลายเชื้อด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าดูดซับคลื่นแสง optical density (O.D.) เท่ากับ 0.1 ที่ 600 nm สารละลายเชื้อที่ได้นำไปทำ serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ทุกความเข้มข้นของ dilution นำไปตรวจที่ปริมาณเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 50 ul เขี่ยให้ทั่วหน้าอาหาร Semi-selective for *Xanthomonas* (SX medium) (Schaad, 1988) เก็บไว้ที่ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

การตรวจหาแบคทีเรียโดย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

specific primer สืบค้นข้อมูล primer ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์โดยวิธี Real time PCR ต่อไป

ปฏิกิริยา Real time PCR การทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์กับพืชตระกูลส้ม ทดสอบกับเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ซึ่งเป็นสารละลายผสม(Master mix) ทีjมี SYBR green ที่มีสี fluorescent dye เป็นตัวตรวจปฏิกิริยา Real time PCR ตัวอย่างจะทำปฏิกิริยาในถาดพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler 480 Mutiwell plate 96) ในการทำปฏิกิริยาจะต้องมี ตัวควบคุมลบ (negative control) ใช้น้ำกลั่นแทน DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และตัวควบคุมบวก (positive control) ใช้ DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทุกครั้ง

การทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix, SYBR green dye และ $MgCl_2$), 0.25 uM primer และ 1 ul DNA ของ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยมีโปรแกรม สำหรับปฏิกิริยา Real time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	94	00:04:00	4.40	none
Amplification	40	94	00:00:15	4.40	none
		58	00:00:15	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
		72	00:05:00	4.40	single
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		72	00:01:00	2.20	none
		97	00:00:00	0.11	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

การทำปฏิกิริยา Real time PCR ในขณะที่ทำปฏิกิริยาเครื่อง LightCycler® 480 จะตรวจจับ SYBR green fluorescence ที่จะแทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา Real time PCR

ซึ่ง crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย ที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า background ค่า Cp จึงใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมาย และบอกได้ถึงปริมาณของผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยถ้ามีผลผลิต PCR เป้าหมายมาก ค่า Cp จะต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ตัวที่สองในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมายเพราะว่าค่า melting curve ช่วยในการตรวจสอบการสร้างผลผลิต PCR เป้าหมาย โดยผลผลิต PCR เป้าหมายที่ได้จากปฏิกิริยา Real time PCR ของแต่ละชนิดแบคทีเรีย ให้ลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย (melting temperature (Tm)) เฉพาะตัวแตกต่างกันไป การวิเคราะห์ค่า Tm จึงสามารถใช้ในการจำแนกผลผลิต PCRที่ไม่ใช่เป้าหมายและ primer-dimer ที่เกิดขึ้น การรายงานผลทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับค่า Cp และ การวิเคราะห์ melting curve

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของ primer ทั้ง 3 คู่ ใช้ DNA และเซลล์ของแบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *citri* ที่ แยกได้จากพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆในประเทศไทยจำนวน 50 ไอโซเลท (Table 1) และ เชื้อในกลุ่ม *Xanthomonas* ได้แก่ แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae, X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. oryzae* (Table 1) โดยความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การทดสอบความไวในการตรวจสอบเชื้อแคงเคอร์ (sensitivity) ของ primer โดยใช้ DNA ของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ใช้สภาวะของปฏิกิริยา Real time PCR ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเคอร์

ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอจากแปลงเกษตรกรใน อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัดแผลตัวอย่างโรค โดย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm นำตัวอย่างใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml นำส่วนน้ำใส 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการใช้วิธี standard PCR ด้วย primer D1/D2 (ณัฏฐิมา และคณะ 2548) และ primer 2/3 (Hartung *et.al*., 1993) และทุกตัวอย่างนำมาแยกเชื้อบนอาหาร semi-selective for *Xanthomonas* (SX media) โดยนำตัวอย่างโรคแคงเคอร์แต่ละตัวอย่างปริมาณ 50 ไมโครลิตรไปเกลี่ยให้ทั่วบน

อาหารเลี้ยงเชื้อ SX โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอล บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28° C นาน 72 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อที่ขึ้นบนอาหาร

การทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากแปลงปลูกส้มโอ

ทำการเก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอ จากแปลงปลูกของเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแคงเคอร์ โดยเก็บตัวอย่างใบของส้มโอ ที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ และตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการของโรค จำนวน 50 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ โดยนำตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่เติมด้วย 25 ml ของสารละลาย PBS นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นน้ำใส เก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS จำนวน 500 µl นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR โดยใช้ primer 2/3 ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทำการตรวจเชื้อบนอาหาร SX medium ในทุกตัวอย่าง

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

การตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ เป็นไปตามประกาศของกรมวิชาการเกษตร เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและการออกใบรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการส่งออกผลส้มโอไปสหภาพยุโรป พ.ศ. 2556 ต้องปฏิบัติตามระเบียบ EC Plant Health Directive 2000/29/EC ได้กำหนดเงื่อนไขการอนุญาตนำเข้า ผลของพืชสกุลส้มจากประเทศไทย ต้องได้รับการตรวจรับรองแหล่งผลิตว่าปลอดจากโรคแคงเคอร์ ที่ผลต้องไม่ปรากฏอาการของโรคข้างต้นและทำการจุ่มผลในสารละลายกำจัดเชื้อโรค ที่อาจปนเปื้อนที่ผิว ซึ่งการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ให้ปฏิบัติตามคู่มือ การปฏิบัติงานตรวจสอบและรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ ของกรมวิชาการเกษตร (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2550) โดยเกษตรกร ผู้ใดประสงค์จะขอใบสำคัญแสดงการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ สำหรับการส่งออกไปสหภาพยุโรป ให้ยื่น ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่ ณ กลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ภายในเดือนธันวาคมของทุกปี จากนั้นกลุ่มบริการส่งออก ส่งรายชื่อเกษตรกรพร้อมข้อมูลแปลงปลูกให้กับสำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย จากนั้นเจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย ไปตรวจแปลงผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปยังสหภาพยุโรป โดยการสังเกตลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์บนต้นส้มโอ ทุก 60 วัน ตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของรอบการเจริญเติบโตของส้มโอ จนถึงช่วงระยะเวลาเก็บเกี่ยว พร้อมเก็บตัวอย่างกิ่งส้มโอที่มีใบคลี่เต็มที่แล้ว (ใบเพสลาด)โดยสุ่มเก็บจำนวน 3 กิ่ง/ต้น จำนวน 25 ต้น/สวน นำมาตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri*

การตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ

การตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ ดำเนินการตามวิธีการของ อรพรรณ และคณะ (นำตัวอย่างกิ่งส้มโอ เก็บเฉพาะใบส้มโอ ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 ml ที่เติมด้วย สารละลาย PBS buffer จำนวน 250 ml นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียที่ติดอยู่ภายนอกใบส้มโอถูกล้างออกมา จากนั้นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนบนที่เป็นน้ำใส เก็บส่วนตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลาย PBS buffer จำนวน 500 µl นำมาตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยวิธี Real time PCR ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media)

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.57 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจหาแบคทีเรียโดย *X. axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time PCR

specific primer จากการสืบค้นข้อมูลพบ primer มีรายงานว่าสามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* คัดเลือก primer ที่ ออกแบบมาจาก ยีน pathogenicity gene *(pthA gene)* ของแบคทีเรีย *X. axonopodis pv. citri* ซึ่ง *pthA gene* พบเฉพาะในแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เป็นยีนที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียชนิดนี้ในการชักนำให้เกิดโรคแคงเคอร์ในพืชตระกูลส้ม (Swarup *et al.*, 1991) โดยยีนนี้จะทำให้เกิดลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์เฉพาะในพืชตระกูลส้มเท่านั้น (Duan *et al.* 1999) ลำดับเบสของ *pthA gene* ถูกอนุรักษ์ไว้ให้เหมือนกันและถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อๆ ไป การเลือกprimer ที่ออกแบบจาก *pthA gene* จะทำให้ได้ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ที่เป็นสาเหตุโรคแคงเคอร์กับพืชตระกูลส้ม ในการทดลองจึงได้เลือก primer จำนวน 4 ชุด ดังนี้

1. Primer D1 (GGCCTTGATCAAAAGAACCA) และ D2 (TTGAAGTAGGGGACGGTTTA) จากรายงานของ ณัฏฐิมา และคณะ (2548) ที่ออกแบบจาก *pthA* gene ของเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* strain 306 และ GenBank accession number XCU28802 มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A
2. primer 2 (CACGGGTGCAAAAAATCT) และ 3 (TGGTGTCGTCGCTTGTAT) จากรายงานของ Hartung *et.al* (1993)
3. primer VM3 (GCATTTGATGACGCCATGAC0 VM4 (TCCCTGATGCCTGGAG GATA) จากรายงานของ Mavrodieva et.al (2004)

นำลำดับเบสของ primer ทั้ง 4 ชุดไปสั่งสังเคราะห์ primer จากหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ

การทดสอบ primer จากการทดสอบ primer ทั้ง 3 คู่ โดยใช้อุณหภูมิในการจับคู่ primer กับ DNA ของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ต้นแบบ (annealing) ที่ 58 ºC พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA ได้จาก DNA ต้นแบบ โดยมีการวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากทั้ง 3 คู่ พบว่า มีค่า Tm ที่แตกต่างกัน โดย Tm ของคู่ primer D1/D2 primer 2/3 และ primer VM3/VM4 คือ 89.03ºC , 87.73 ºC และ 88.1 ºC ตามลำดับ (Fig 1)

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ primer

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer ทั้ง 3 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท (Table 2) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X axonopodis* pv. *malvacearum*, *X. axonopodis* pv. *glycines*, *X. axonopodis* pv. *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae, X. axonopodis* pv. *manihotis*, *X campestris* pv. *campestris* และ *X. oryzae* โดยให้ค่า Cp สูงกว่า 35 รอบ และการวิเคราะห์ melting curve พบว่าค่า Tm ที่ได้ของแต่ละชนิดแบคทีเรียไม่ตรงกับค่า Tm ที่ได้จากแบคทีเรีย *X . axonopodis* pv. *citri* (Table 2; Fig 2) ผลการทดสอบพบว่า primer 2/3 ให้ค่า Cp ต่ำที่สุดที่ 18.54 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูง ถึง 36.343 (Fig 3) ส่วน primer D1/D2 ให้ค่า Cp ต่ำรองลงมาที่ 19.61 และตรวจค่าสี SYBR green fluorescence สูงเท่ากับ primer 2/3 (Fig 4) ในขณะที่ primer VM3/VM4 ให้ค่า Cp สูงที่ 23.33 แต่ให้ค่า SYBR green fluorescence สูงที่สุดที่ 42.329 (Fig 5)

จากผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่า primer D1/D2, primer 2/3 และ primer VM3/VM4 มีความจำเพาะกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์เท่านั้น เนื่องจาก primer ทั้ง 3 คู่ออกแบบมาจาก ยีน *pth A* ที่เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะอาการของจุดแผลตกสะเก็ดปากแผลแตกออกคล้ายปล่องภูเขาไฟ (Swarup *et al.*, 1991) ซึ่งเป็นลักษณะอาการของโรคแคงเคอร์จะมีอยู่เฉพาะในแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* เท่านั้น (Duan *et al.* 1999) โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากต้นแบบของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* ที่พบในประเทศไทย ทั้ง 50 ไอโซเลท แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จากแบคทีเรียกลุ่ม *Xanthomonas* อื่นๆ และแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* ซึ่งที่พบในประเทศไทย เป็น สายพันธุ์ canker A (ณัฏฐิมาและวงศ์, 2546) ผลการทดสอบได้ผลเช่นเดียวกับที่มีรายงานไว้ (Hartung *et al.*,1993; ณัฏฐิมา และคณะ, 2548 และ Mavrodieva *et al.*,2004)

ผลการทดสอบความไวในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ของ primer ทั้ง 3 คู่ พบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจเชื้อ *X .axonopodis* pv. *citri* ที่ความเข้มข้นต่ำสุด

ของ DNA คือ 5 พิโคกรัม (Table 3) และความเข้มข้นของ เซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ 81 CFU/ml (Table 4; Fig 3 และ 4) เช่นเดียวกัน ในขณะที่ ความไวในการตรวจของ primer VM3/VM4 ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA คือ 500 pg (Table 3) และความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่ำสุดคือ $8.1x10^6$ CFU/ml (Table 4; Fig 5) จากผลการทดสอบพบว่า primer D1/D2 และ primer 2/3 มีความไวในการตรวจการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ดีกว่า primer VM3/VM4 โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ primer VM3/VM4 ยังเกิด primer dimers ที่เกิดจากการจับกันเองของ primer ในหลุมที่มีปริมาณความเข้มข้นของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ต่ำๆ โดยทำให้เกิด peak ในการวิเคราะห์ melting curve จำนวน 2 peak อาจเนื่องจากขนาดของผลผลิต PCR มีขนาดเล็ก ทำให้มีโอกาสที่ primer จะจับกันเองสูง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายได้ดี (Chou *et al*. 1992) จากผลการทดลองการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถใช้primer D1/D2 และ primer 2/3 ให้ผลการทดสอบเหมือนกันทั้ง ความเฉพาะเจาะจงและความไว

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv.*citri* จากตัวอย่างโรคแคงเคอร์

ผลการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างส้มโอที่สงสัยว่าเป็นโรคแคงเคอร์ที่เก็บมาแปลงปลูกส้มโอ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 พบว่าวิธี Real time PCR สามารถตรวจพบโรคแคงเคอร์ทั้งจำนวน 10 ตัวอย่าง ทั้งprimer D1/D2 และ primer 2/3 (Table 5) เช่นเดียวกับการตรวจหาด้วยวิธี standard PCR ที่สามารถตรวจพบโรคแคงเคอร์ได้ทั้ง 10 ตัวอย่างและการแยกเชื้อด้วยอาหาร SX ที่พบโคโลนีของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* เจริญในอาหาร จำนวน 10 ตัวอย่าง (Table 5) แต่การตรวจสอบโดยเทคนิค Real time PCR ด้วย primer D1/D2 และ primer 2/3 สามารถตรวจสอบและทราบผลภายใน 2-3 ชั่วโมง โดยเห็นผลการตรวจสอบตามเวลาที่แท้จริง หน้าจอของเครื่อง Real time ไม่ต้องรอเสร็จสิ้นปฏิกิริยา และไม่ต้องนำไปทำ electrophoresis ใน แผ่น agrarose gel และย้อมด้วย ethedium bromide เหมือนกับ วิธี standard PCR ซึ่ง ethedium bromide เป็นสารอันตรายที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ และการตรวจด้วยอาหาร SX ต้องใช้เวลา 3-4 วัน จึงจะทราบผลว่าตัวอย่างใดปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* และการใช้ดังนั้นการใช้ เทคนิค Real time PCR จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ รวดเร็วทำให้ปลอดภัย และการประหยัดเวลา และสามารถนำไปใช้ในงานตรวจรับรองสินค้าเพื่อการส่งออกและตรวจรับรองเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ได้ต่อไปในอนาคต

การทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* จากแปลงปลูกส้มโอ

จากการเก็บตัวอย่างโรคแคงเคอร์ของส้มโอ จากแปลงเกษตรกรที่มีการระบาดของโรคแคงเคอร์ในจังหวัดเชียงราย พิจิตร ปทุมธานี ชัยนาท และ นครปฐม จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างที่แสดง

อาการของโรคแคงเคอร์ จำนวน 24 ตัวอย่างและตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการจำนวน 26 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบว่าวิธี Real time PCR โดยใช้primer 2/3สามารถตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* พบทั้งหมด 44 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 50 ตัวอย่าง คิดเป็น 88% โดยวิธี Real time PCR สามารถตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่างได้ (Table 6) เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกเชื้อได้ 38 ตัวอย่าง (Table 6) โดยพบว่า ตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมดตรงกับที่ตรวจได้จากวิธี Real time PCR และตัวอย่างที่ตรวจด้วยวิธี Real time PCR แล้วไม่พบก็ไม่สามารถแยกเชื้อบนอาหาร SX media ได้เช่นกัน แต่จากผลทดลองพบว่าการแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium สามารถแยกได้น้อยกว่าการตรวจหาเชื้อโดยวิธี Real time PCR เนื่องมาจากอาหาร SX medium เป็นอาหารเฉพาะ (selective medium) มีส่วนประกอบที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดที่ไปลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ทำให้แยกเชื้อได้น้อยกว่า โดยพบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium (plating efficiency) อยู่ที่ 54.4 % เมื่อเทียบกับการเจริญบนอาหาร nutrient agar (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) แต่ไม่สามารถใช้อาหาร NA ในการแยกนับเชื้อได้เนื่องจากเชื้อแซปโปรไฟท์ชนิดอื่นๆ ที่มีปะปนอยู่จะเจริญได้เร็วกว่าและขึ้นคลุมทับก่อนที่เชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จะเจริญ นอกจากนี้การที่ไม่สามารถแยกเชื้อได้อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะที่มีชีวิตแต่ไม่สามารถเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (viable but nonculturable state (VBNC)) (Oliver, 2005) ซึ่ง Oliver (2000) ได้รายงานระยะ VBNC ของแบคทีเรียที่ทำให้ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นประจำ แต่พบว่าเชื้อแบคทีเรียยังคงมีชีวิต และสามารถเจริญเติบโตขึ้นมาใหม่ได้ เซลล์ในระยะนี้มีระดับการเจริญเติบโตต่ำ แต่สามารถฟื้นฟูให้เจริญเติบโตบนอาหารได้อีกครั้ง ได้มีรายงานการใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชในกลุ่มสารประกอบทองแดง ไปกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียอยู่ในระยะ VBNC เพื่อความอยู่รอด เช่น *X. campestris* pv. *campestris* (Ghezzi *et al.*, 1999), *Erwinia amylovora* (Ordax *et al.*, 2006) เป็นต้น ซึ่งในการป้องกันกำจัดโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทย มีการใช้สารประกอบทองแดง เช่น คอปเปอร์ออกซิคลอไรด์ ในการป้องกันกำจัดซึ่งอาจไปกระตุ้นให้เชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ไปอยู่ในระยะ VBNC ทำให้ไม่สามารถเลี้ยงเชื้อได้ แต่วิธี Real time PCR นั้นมีประสิทธิภาพในการตรวจเซลล์ของเชื้อ สามารถตรวจเซลล์ที่อยู่ในระยะ VBNC และเซลล์ที่ตายได้ (Wolf *et al.*, 2000) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การใช้วิธี Real time PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สูง สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ ดังนั้นวิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกร่วมกับการสำรวจโรคในแปลง เพื่อการตรวจรับรองแปลงปลอดโรคแคงเคอร์ในอนาคตได้

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์

การตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ เพื่อส่งไปสหภาพยุโรป ในปี 2556-2557 มีเกษตรกรผู้ประสงค์จะขอใบสำคัญแสดงการรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ สำหรับการส่งออกไปสหภาพยุโรป มีจำนวน 93 ราย รวม 103 แปลง เจ้าหน้าที่จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงรายได้ สุ่มเก็บตัวอย่างกิ่งส้มโอ จำนวน 2 ครั้ง คือในเดือนมีนาคม และเดือนมิถุนายน 2557 โดยสุ่มเก็บจำนวน 3 กิ่ง/ต้น จำนวน 25 ต้น/สวน นำมาตรวจขั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการ เพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* โดยเทคนิค Real time PCR ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ผลการตรวจพบว่า ตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ จำนวน 19 แปลง โดยตรวจพบในเดือน มีนาคม 2557 จำนวน 11 แปลง และตรวจพบเพิ่มในเดือน มิถุนายน 2557 จำนวน 8 แปลง (Table 7) ทุกตัวอย่างที่ตรวจพบสามารถแยกหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium ได้ ยกเว้นตัวอย่างที่มีค่า Cp 35 ซึ่งมีปริมาณเชื้อน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถเจริญขึ้นบนอาหารได้ (Table 7) เนื่องจากอาหาร SX medium เป็นอาหารเฉพาะ (selective medium) มีส่วนประกอบที่เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิดทำให้ลดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ลงทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อในจำนวนน้อย ๆได้ แปลงปลูกส้มโอที่มีการตรวจพบตั้งแต่ครั้งแรกในเดือนมีนาคม 2557 จะถูกตัดออกไป ไม่มีการตรวจแปลงและสุ่มตัวอย่างมาตรวจละเอียดในห้องปฏิบัติการอีกในครั้งที่ 2 เดือนมิถุนายน 2557 กลุ่มวิจัยโรคพืช รายงานผลการตรวจชั้นละเอียดในห้องปฏิบัติการไปยังศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเชียงราย เพื่อดำเนินการออกและนำส่งหนังสือสำคัญแสดงการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอ ให้แก่ด่านตรวจพืชเชียงของ จังหวัดเชียงราย หรือกลุ่มบริการส่งออกสินค้าเกษตร สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร เพื่อดำเนินการควบคุมในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช โดยมีการระบุข้อความเพิ่มเติมในใบรับรองปลอดศัตรูพืช “Pomelo in this consignment has been inspected and treated under control of DOA Thailand according to EU 2000/29/EC annex 4A1 articles 16.2 c1, 16.3 A, 16.4 A, 16.5 C" ผลจากการตรวจหาเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ในแปลงปลูกส้มโอเพื่อการตรวจรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ร่วมกับการสำรวจโรคในแปลง ทำให้ในปี 2556-2557 สามารถรับรองแหล่งผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์ได้จำนวน 84 แปลง ได้ออกใบรับรองสุขอนามัยพืชไปยังสหภาพยุโรป จำนวน 19 ฉบับ ปริมาณ 208,440 กิโลกรัม รวมเป็นรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอในอำเภอเวียงแก่นคิดเป็นมูลค่า 3,126,600 บาท โดยไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง (ข้อมูลจากด่านตรวจพืชเชียงของ) จากดำเนินจะเห็นได้ว่า การใช้วิธี Real time PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีความไวและความเฉพาะเจาะจงในการตรวจหาเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri* สูง สามารถตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ

ทำให้สามารถตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อคงสถานภาพการปลอดโรคแคงเคอร์ของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของสหภาพยุโรป และวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomomnas axonopodis* pv. *citri* ด้วยเทคนิค Real time โดยใช้ primer D1/D2 และ primer 2/3 ที่ออกแบบมาจาก ยีน avirulence/ pathogenicity *(pthA gene)* มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* สายพันธุ์ canker A โดยสามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย *X .axonopodis* pv. *citri* ที่พบในประเทศไทยทั้ง 50 ไอโซเลท มีความไว(sensitivity) ในการตรวจ ชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดของDNA เท่ากับ 5 pg และความเข้มข้นต่ำสุดของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจได้คือ 81 CFU/ml นำไปทดสอบการตรวจหาแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* จากตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคแคงเคอร์จากแปลงปลูกส้มโอ ที่ อ.เวียงแก่น จ.เชียงราย จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 10 ตัวอย่าง วิธีการนี้สามารถตรวจพบแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* ได้อย่างแม่นยำทั้งในตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์ชัดเจนและตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการ ผลจาการนำวิธี Real time PCR ไปใช้ตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอของแปลงปลูกเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรป โดยดำเนินการในปี 2556-2557 ที่แปลงปลูกส้มโอที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย จำนวน 103 แปลง ผลการตรวจรับรองพบว่าการใช้เทคนิค Real time PCR สามารถตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอเพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ทั้งหมด 84 แปลง ได้ออกใบรับรองสุขอนามัยพืชไปยังสหภาพยุโรป จำนวน 19 ฉบับ ปริมาณ 208,440 กิโลกรัม รวมเป็นรายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอในอำเภอเวียงแก่นคิดเป็นมูลค่า 3,126,600 บาท โดยไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง

การนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ โดยเทคนิค Real time PCR เป็นวิธีตรวจสอบ ที่มีประสิทธิภาพมีความไวและความเฉพาะเจาะจง ตรวจหาเชื้อที่มีปริมาณต่ำ สามารถนำไปใช้ในการตรวจรับรองแปลงตลอดระยะเวลาผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์เพื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปได้ ผลผลิตส้มโอที่ได้เมื่อส่งไปยังสหภาพยุโรปแล้วไม่มีพบการแจ้งเตือนกลับจากประเทศปลายทาง ซึ่งวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับในการผลิตส้มโอเพื่อส่งออกไปสหภาพยุโรป ทำให้ประเทศไทยสามารถเปิดตลาดการส่งออกส้มโออย่างถูกต้อง ตามกฎข้อบังคับของ

สหภาพยุโรปและวิธีการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการตรวจรับรองสวนเพื่อส่งออกไปประเทศอื่นที่กำหนดให้โรคแคงเคอร์เป็นศัตรูพืชกักกันได้ ทำให้ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตส้มโอคุณภาพดีในตลาดโลก

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช 2550. คู่มือการตรวจรับรองส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์เพื่อการส่งออกไปสหภาพยุโรป สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 28 หน้า

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2546. รวบรวมสายพันธุ์ อนุกรมวิธานของเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มในประเทศไทยและการเก็บรักษาภายใต้น้ำมันพาราฟินและน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2546 เล่มที่2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.หน้า 932 – 948.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ ปิยะรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ วิชัย โฆสิตรัตน และวงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแคงเคอร์ของพืชตระกูลส้มโดยวิธี Polymerase Chain Reaction. วารสารโรคพืช ปีที่19 ฉบับที่1-2 หน้า 35-46.

Chou, Q., Russell, M., Birch, D., Raymond, J., and Bloch, W. 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number mplifications.Nucleic Acids Research. Apr 11, 1992; 20(7)1717

Duan, Y.P., A.L. Castaneda, G. Zhao, and D.W. Gabriel. 1999. Expression of a single, host-specific, bacterial pathogenicity gene in plant cells elicits division, enlargement and cell death. Mol. Plant Microbe Interact. 12: 556-560.

Ghezzi, J.I. and T.R. Steck. 1999. Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in liquid microcosms and sterile soil. FEMS Microbiol. Ecol. 30 : 203-208.

Hartung, J. S., Daniel, J. F. and Pruvost, O. P .1993. Detection of Xanthomonas campestris pv. citri by the polymerase chain reaction method. Appl Environ Microbiol ;59:1143-8

Hartung, J. S., Pruvost, O. P ,Villemot I.,and Alvarez, A. 1996. Rapid and colorimetric detection of Xanthomonas axonopodis p.v. citri by immunocapture and nested – polymerase chain reaction assay. Phytopathology 86:95-101.

Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. J. Microbiol. 43 : 93-100.

Oliver, J.D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria, p. 277-299. *In* R.R. Colwell and D.J.Grimes (eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment. American Society for Microbiology Press, Washington,D.C.

Ordax, M.E., Marco-Noales, M.M. Lopez and E.G. Biosca. 2006. Survival strategy of *Erwinia amylovora* against Copper : Induction of the Viable-but-Non culturable state. Appl. Environ. Microbiol. 76 : 3482-3488.

Picher, D. G., N. A. Saunders, and R. Owen. 1989. Rapid extration of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett. Appl. Microbiol. 8: 151-156.

Roberts ,P. R., Jone,J. B., Chandler,C. K., Stall,R. E. and Berger, R. D.1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primer and nested polymerase chain reaction . Plant Dis. 80 :1283-1288.

Schaad, N.W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 2nd ed. American Phytopathological Society , St. Paul , Minnesota.

Swarup, S., De Feyter, R., Brlansky, R.H., and Gabriel, D. W. 1991. A pathogenicity locus from Xanthomonas citri enables strains from several pathovars of X. campestris to elicit cankerlike lesions on citrus. Phytopathology 81:802-809.

Wolf, J.M., S.G.C. Vriend, P. Kastelein, E.H. Nijhuis, P.J. van Bekkum and J.W.L. van Vuurde. 2000. Immunofluorescence colony-staining (IFC) for detection and quantification of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* biovar 2 (race 3) in soil and verification of positive results by PCR and dilution plating. Euro. J. Plant Pathol. 106: 123–133.

Table 1 Strains of *Xanthomonas* spp. used in this study.

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
Xanthomonas axonopodis pv. *citri*				
873	ส้มเขียวหวาน	ปทุมธานี	2532	1
944	มะนาวตาฮิติ	น่าน	2532	1
950	ส้มฟรีมองต์	เชียงใหม่	2532	1
956	มะนาวไข่	มุกดาหาร	2532	1
967	มะกรูด	ชลบุรี	2532	1
944	มะนาวตาฮิติ	น่าน	2532	1
1047	ส้มโอ	ปทุมธานี	2533	1
1049	มะนาว	นนทบุรี	2533	1
1055	มะกรูด	นนทบุรี	2533	1
1095	ส้มโอ	เชียงราย	2534	1
1110	ส้มโอ	พัทลุง	2534	1
1123	ส้มโอ	นครพนม	2534	1
1189	ส้มโอ	พิจิตร	2535	1
1582	ส้มโอ	เชียงราย	2544	1
1584	ส้มโอ	พิษณุโลก	2544	1
1588	ส้มโอ	ชลบุรี	2545	1
1619	ส้มเขียวหวาน	จันทบุรี	2545	1
1623	มะนาว	ปทุมธานี	2545	1
1627	ส้มโอ	พิจิตร	2546	1
1628	ส้ม	ชุมพร	2546	1
1629	มะนาว	ตาก	2546	1
1632	ส้มโอ	กำแพงเพชร	2546	1
1720	ส้มตรา	เชียงราย	2547	1
1754	ส้มโอ	สกลนคร	2547	1
1767	ส้มโอ	ตราด	2547	1
1782	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1783	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1784	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1788	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1791	ส้มโอ	เชียงราย	2547	1
1805	ส้มโอ	ปัตตานี	2547	1
1814	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1816	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1819	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1

Table 1 (Continued)

สายพันธุ์	พืชอาศัย	แหล่งเก็บตัวอย่าง	ปีที่เก็บเชื้อ	แหล่งที่มา
1823	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1825	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1826	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1830	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1831	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1832	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1833	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1834	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2547	1
1841	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1843	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1855	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	1
1856	ส้มโอ	กาญจนบุรี	2548	1
1880	ส้มโอ	เชียงราย	2548	1
1886	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	1
1887	มะกรูด	กรุงเทพมหานคร	2548	1
X. axonopodis pv. *malvacearum*				
1232	ฝ้าย	ปราจีนบุรี	2536	1
X. axonopodis pv. *glycines*				
1330	ถั่วเหลือง	สุโขทัย	2537	1
X. axonopodis pv. *vesicatoria*				
1726	พริก	ลำปาง	2547	1
X. axonopodis pv. *differenbachiae*				
1058	หน้าวัว	กรุงเทพฯ	2534	1
X. campestris pv. *campestris*				
1104	ผักกาดเขียว	สงขลา	2534	1
X. oryzae pv. *oryzae*				
TB0003	ข้าว	นครพนม	2543	1
X. axonopodis pv. *manihotis*				
1682	มันสำปะหลัง	ระยอง	2546	1

1/ หน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Table 2 The result of specificity using primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 were detected *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR

รายชื่อเชื้อ	ค่า Cp ของการตรวจโดยวิธี Real time PCR		
	Primer D1/D2	**Primer 2/3**	**Primer VM3/VM4**
X. axonopodis pv. *citri* (50) [1/]	19.61	18.56	23.33
X. axonopodis pv. *malvacearum*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *glycines*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *vesicatoria*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *differenbachiae*	>35	>35	>35
X. campestris pv. *campestris*	>35	>35	>35
X. oryzae pv. *oryzae*	>35	>35	>35
X. axonopodis pv. *manihotis*	>35	>35	>35

Table 3 The result of sensitivity using primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 were detected DNA of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR

DNA concentration	**primers** D1/D2	**primers** 2/3	**Primers** VM3/VM4
	Cp	**Cp**	**Cp**
50 ng	20.92	22.22	28.46
5 ng	23.08	26.00	31.65
1 ng	25.58	29.67	32.75
500 pg	26.76	30.67	33.19
50 pg	29.02	32.36	>35
5 pg	33.06	33.88	>35
1 pg	>35	>35	-
100 fg	-	-	-

Table 4 The result of sensitivity using primer D1/D2, primer 2/3 and primer VM3/VM4 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR

Bacterial cells	**CFU/ ml**	**primers** D1/D2	**primers** 2/3	**Primers** VM3/VM4
		Cp	**Cp**	**Cp**
O.D. 0.1 $_{600\ nm.}$	$8.1x10^{8}$	19.25	18.73	23.33
10^{-1}	$8.1x10^{7}$	23.47	22.31	25.02
10^{-2}	$8.1x10^{6}$	25.15	26.09	28.17
10^{-3}	$8.1x10^{5}$	25.68	26.73	>35
10^{-4}	$8.1x10^{4}$	26.72	29.71	>35
10^{-5}	$8.1x10^{3}$	30.09	30.15	>35
10^{-6}	$8.1x10^{2}$	30.18	32.19	>35
10^{-7}	81	31.61	33.63	>35
10^{-8}	8	35	35	-

Table 5 The result of detected *Xanthomonas axonopodis* pv.*citri* in pomelo canker disease using Real time PCR and Standard PCR with primers D1/D2 and primer 2/3 and isolated on selective media for Xanthomonas (SX media)

Sample	Real time PCR		Standard PCR		SX media
	Primer D1/D2 Cp	Primer 2/3 Cp	Primer D1/D2	Primer 2/3	
1	29 (+)	28 (+)	+	+	+
2	21.65 (+)	20.65 (+)	+	+	+
3	29 (+)	28 (+)	+	+	+
4	27.08 (+)	26.60 (+)	+	+	+
5	33 (+)	32.04 (+)	+	+	+
6	34 (+)	33.65 (+)	+	+	+
7	20.4 (+)	19.56 (+)	+	+	+
8	30 (+)	28 (+)	+	+	+
9	29.5 (+)	28 (+)	+	+	+
10	28.6 (+)	27 (+)	+	+	+

Table 6 Real time PCR testing methods in the detection of Xanthomonas axonopodis pv. citri from Pomelo Orchards.

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	Real time PCR[1/]	Isolation SX media[2/]
1. ตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์	24[3/]	24[4/]	24
2. ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการของโรคแคงเคอร์	26	20	14
รวม	**50**	**44**	**38**

1/ การตรวจด้วยวิธี **Real time PCR** จากการวิจัยในครั้งนี้

2/ การตรวจแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. axonopodis* pv. *citri* บนอาหาร SX medium

3/ จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ

4/ จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *X. axonopodis* pv. *citri*

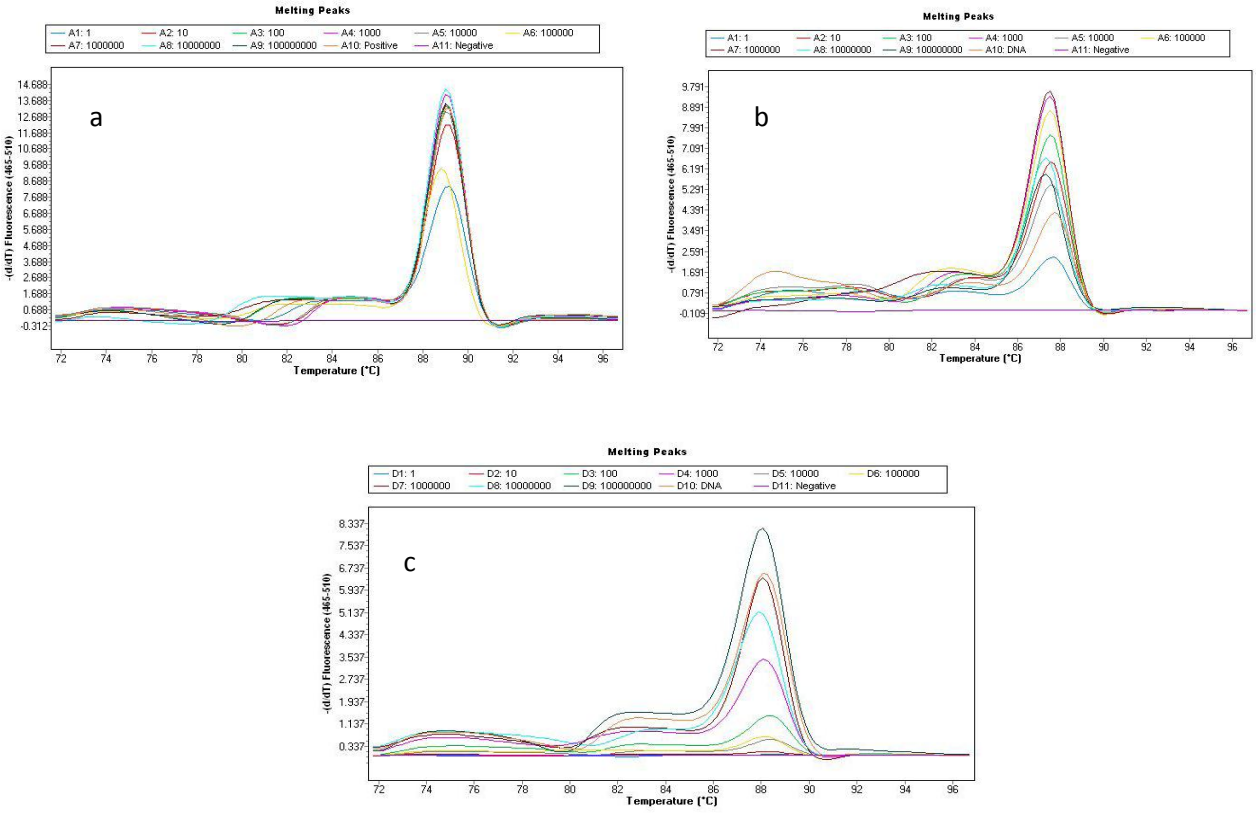


Fig. 1 Analysis melting curve of PCR product from detected primer pair 3 it was found Tm different.

a. Tm of PCR product from primer D1/D2 of 89.03°C

b. Tm of PCR product from primer 2/3 of 87.73 °C

c. Tm of PCR product from primer VM3/VM4 of 88.1 °C

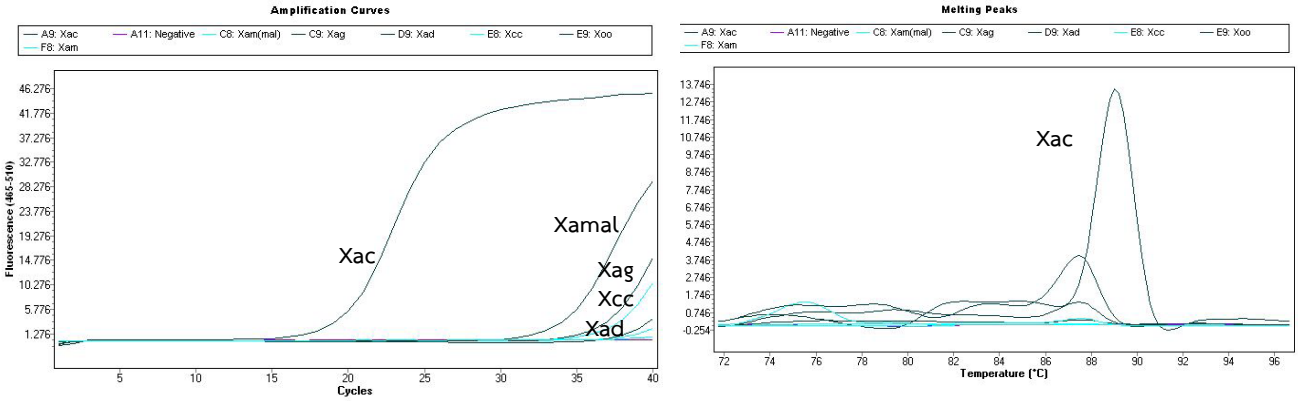


Fig. 2 The result of specificity using primer D1/D2 detected *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) and *Xanthomonas* such as *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (Xamal), *X. axonopodis* pv. *glycines* (Xcg), *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav), *X. axonopodis* pv. *diffenbachiae* (Xad), *X. axonopodis* pv. *manihotis* (Xam), *X campestris* pv. *campestris* (Xcc) and *X. oryzae* pv.*oryzae* (Xoo)

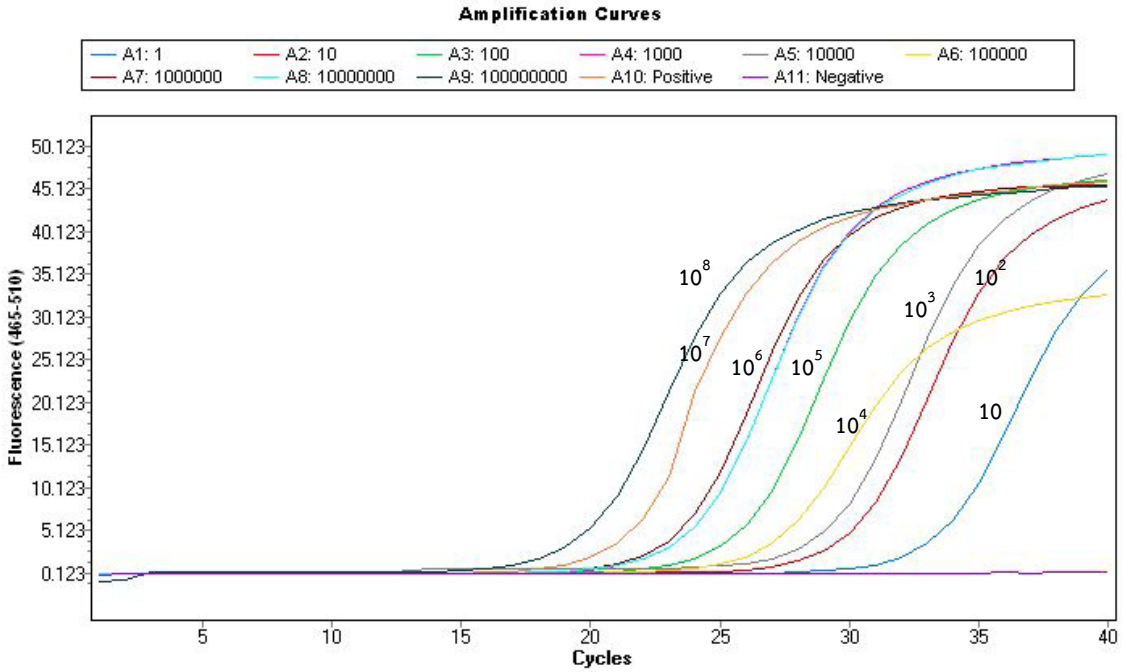


Fig. 3 The result of sensitivity using primer D1/D2 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR.

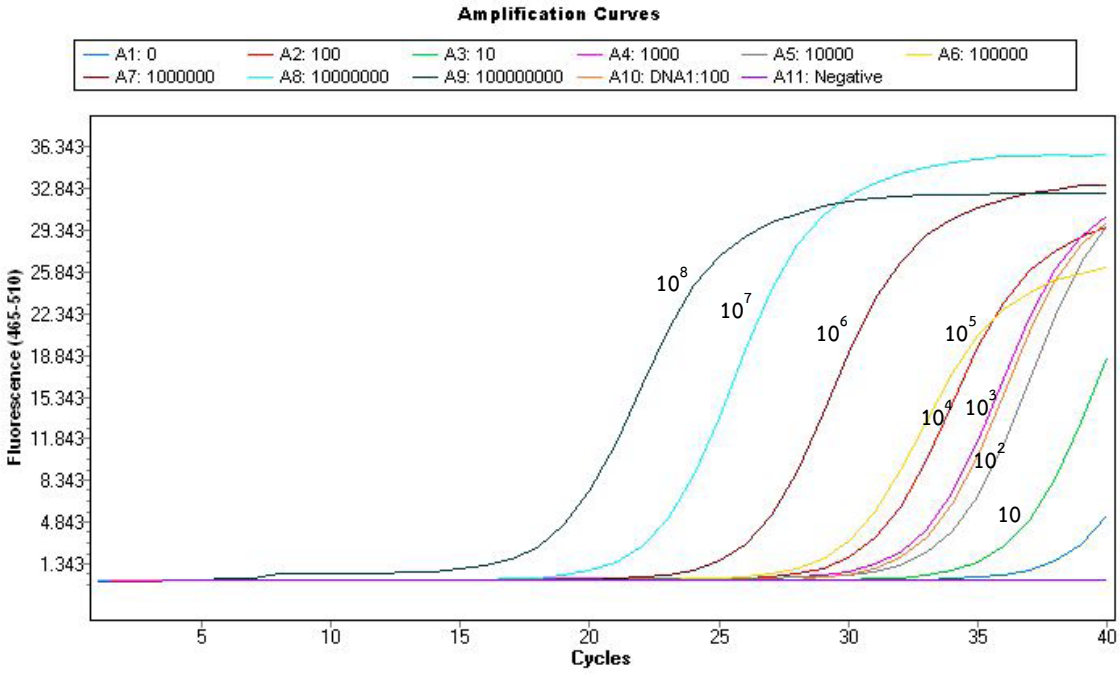


Fig. 4 The result of sensitivity using primer 2/3 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR.

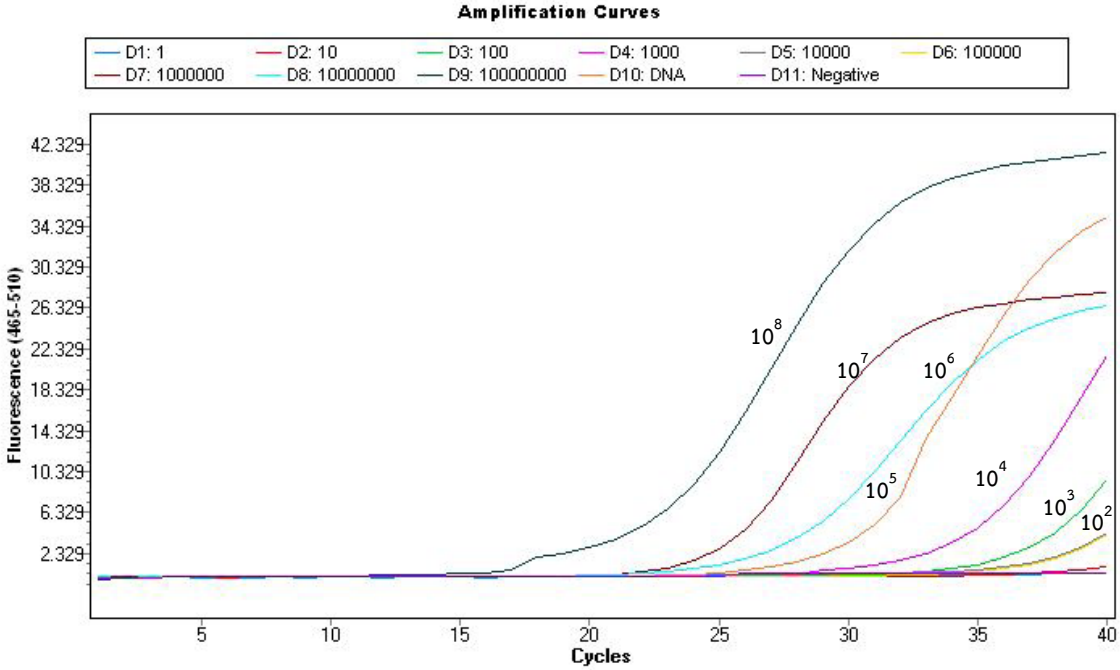


Fig. 5 The result of sensitivity using primer VM3/VM4 were detected suspension of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* using Real time PCR.

Table 7 Result of Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, Causal Agent of Citrus Canker for Certification of Canker Free Orchards

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
001	นายทอง อินเทพ	18 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
002	นายอำนวย อินเทพ	16/2 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
003	นางมาลี เรียงยาย	หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
004	นายสีทน อินเทพ	16 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
005	นายเกรียงศักดิ์ บุดดี	141 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
006	นายปั้น ยาละ	20/2 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
007	นายสมศาสตร์ บุดดี	35 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	32.39	+	+
008	นายสว่าง บุดดี	14 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
009	นางมุกดา ยาละ	29 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
010	นายบุญทา อินเทพ	49 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
011	นายบุญช่วย อินเทพ	108 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
012	นายตาคำ โนขัติ	11/1 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
013	นางดวงคำ เทพสุติน	4 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
014	นายสมพงษ์ อินเทพ	73 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
015	นายฤทธ์ ประชุมพร	57 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
016	นางอาภา ภูมิภาคิน	48 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
017	นายคะนอง บุดดี	41 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
018	นายเจริญ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
019	นางแพน ขันทะ	18 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
020	นายทวี ทิพย์หมึก	113 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
021	นายทวี ทิพย์หมึก	113 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
022	นายชัชวาลย์ รวมจิตร	109 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
023	นายบุญตุ้ม พึ่งบุญ	37 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
024	นายวิชัย เรียงยาย	53 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
025	นายนิมากร รวมจิตร์	65 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
026	นายนพดล ยาละ	75/2 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
027	นายชัชวาลย์ บุคดี	79/2 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
028	นายไชยวัฒน์ นันไชยา	195/3 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
029	นายสุพล ปงลังกา	23 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
030	นายอารุณ อินเทพ	25 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
031	นายรณฤทธิ์ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	26.60	+	ND	ND	+
032	นายรณฤทธิ์ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
033	นายวรศักดิ์ เรียงยาย	119 หมู่ 2 บ้านทุ่งคำ ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
034	นายปรีชา อินเทพ	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
035	นางจำปี บุดดี	หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
036	นายจำรอง บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
037	นางศรีพลอย นันไชย	91 บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
038	นายเจษฎา อินเทพ	106/3 หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
039	นายพล อินจา	98/1 หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
040	นายไวพจน์ บุดดี	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
041	นายนิรันดร์ นิลเนตร	บ้านทุ่งทราย หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
042	นายวุฒิพงษ์ คำลือ	99/2 หมู่ 3 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
043	นายสุขจันทร์ อินทะ	หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
044	นายถนอม กาวงศ์	114/2 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
045	นายนิคม จันทร์วิเศษ	108/3 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
046	นายนิมิตร ทองสุข	51 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
047	นายนิมิตร ทองสุข	51 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	32.33	+	+

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
048	นายประคอง บุดดี	41 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
049	นายปรีชา ยอดฝั้น	20 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
050	นายปรีชา ยอดฝั้น	20 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
051	นางกิติยา มั่งมูล	198 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
052	นางบัวแก้ว ยอดฝั้น	135/1 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
053	นายจิรัฏฐ์ บุดดี	135 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
054	นายสมศักดิ์ บุญยวง	23 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
055	นายสมศักดิ์ บุญยวง	23 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
056	นายสมศักดิ์ บุญยวง	23 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
057	นายสมรัตน์ ยานัน	137 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
058	นายสมรัตน์ ยานัน	137 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	20.56	+	ND	ND	+
059	นายรัตน์ ยานัน	136 หมู่ 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
060	นางเขมาภรณ์ จิรสิงห์	34 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
061	นางเขมาภรณ์ จิรสิงห์	34 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
062	นายสมาน คงทะ	29 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
063	นายสว่าง บุญยวง	27 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
064	นางภัทรนันท์ ยานัน	202 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
065	นางวิไลวรรณ์ ทองสุข	22/3 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
066	นายวิลัย เตรียมทนะ	6 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
067	นายสังวรณ์ เรียงยาย	171/3 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
068	นางสุพิน โนระ	144/1 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
069	นางเกษร กองมงคล	2 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
070	นางอรวรรณ กันคำ	194 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
071	นายอุทัต เตรียมธนะ	169 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
072	นายศรีเนตร ไชยเลิศ	180 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
073	นายพงษ์พันธ์ โนขัติ	167 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	33.39	+	+
074	นายนคร อินเทพ	80/4 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
075	นายบุญวาด บุดดี	41 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
076	นายเสนีย์ นันชัย	213 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
077	นายเสน่ห์ นันชัย	55/1 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.09	+	ND	ND	+
078	นายเสน่ห์ นันชัย	55/1 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	28.00	+	ND	ND	+
079	นายปรทรัพย์ บุญยวง	237 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
080	นายประภาส กันคำ	162 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
081	นายสุรศักดิ์ บุดดี	บ้านหล่ายงาว ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
082	นางรัญจวน ชัยวงศ์	21/1 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
083	นายนิธิพัฒน์ บุญยวง	180 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	31.28	+	ND	ND	+
084	นายอนุรักษ์ คงทะ	96 หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
085	นางสมพร บุดดี	หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
086	นายทัตพล ชัยวงศ์	หมู่ 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
087	นายคำรณ บุดดี	91 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
088	นายบุญส่ง รักพ่อ	หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
089	นายสงัด บุดดี	บ้านม่วง หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
090	นายสมศักดิ์ ทิพย์ตา	หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
091	นายจำเนียร บัวแก้ว	108 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
092	นายอรุณ มหานิล	66/2 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	35.00	+	-
093	นางสาวดรุณี ยาละ	152 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
094	นายณรงค์ฤทธิ์ อินต๊ะ	9 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
095	นายชาญไชย บุดดี	28/2 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
096	นายวิรัตน์ บุดดี	10 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
097	นายนิมากร บุดดี	12/4 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

Table 7 (Continued)

ลำดับที่	ชื่อเจ้าของสวน	ที่อยู่แหล่งผลิต	ผลการตรวจ real time PCR เดือนมีนาคม 2557		ผลการตรวจ realtime PCR เดือนมิถุนายน 2557		ผลตรวจบนอาหาร SX media
			ค่า Cp	ผล	ค่า Cp	ผล	
098	นายสุรชาติ บุดดี	บ้านม่วง หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
099	นายสุรชาติ บุดดี	บ้านม่วง หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
100	นายเทียมจิต ถาริยะ	51 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
101	นายบรรดิษฐ์ จันต๊ะ	9/4 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
102	นายพิชิต รวมจิตร	45 หมู่ 3 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-
103	นางสุริยนต์ วรพัฒน์	13 หมู่ 5 บ้านยายใต้ ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย	>35	-	>35	-	-

การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงคุณภาพในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ

Development on Onion (*Allium cepa var. aggregatum*) Production Technology Transition to Quality in Srisaket Province

นวลจันทร์ ศรีสมบัติ [1/] พเยาว์ พรหมพันธุ์ใจ [1/] ธารทิพย์ ภาสบุตร [2/] นิรมล ดำพะธิก [3/]
อิทธิพล บ้งพรม [1/] บังอร แสนคาน [1/] อุดม คำชา [1/]
Nuanjan Srisombat [1/] Payoaw Phompanjai [1/] Tarnthip Pasabut [2/] Niramon Dumpatik [3/]
Aittjpon Bongprom [1/] Bungorn Sankan [1/] Udom Kumcha [1/]

ABSTRACT

Technology development for quality onion (*Allium cepa var. aggregatum*) production in Sri Saket province was aimed to develop technologies for onion twister (*Colletotrichum gloeosporioides*) eradication, and for increasing onion yield and quality. The experiments were conducted during 2011-2014 in Yang Chum Noi sub-district, Yang Chum Noi district, Sri Saket province. The results revealed that tested method and farmer method yielded at 3,905 and 3,170 kg/rai (commercial yield) with 49,563 and 31,045 baht/rai of benefits, respectively. Benefit cost ratios (BCR) were observed at 2.95 and 2.08, and the disease incidences were observed at 2.72 and 25.64 %, respectively. The onion bulb diameters were 3.44 and 3.21 cm, respectively. The onion sets production suggested that tested method produced 979 kg/rai of yield, 80,214 baht/rai of benefit, 6.30 of BCR, 3.00 % of disease incidence and 1.35 cm of onion head diameter. A test of technology for clean onion production in Nong Mee sub-district, Rasi Salai district, Saket province, suggested that tested method and farmer method gave 5,643 and 4,580 kg/rai of yields, 56,430 and 45,800 baht/rai of benefits, 2.70 and 2.20 of BCRs, 3.20 and 2.80 cm of head diameters, respectively. Whereas, the onion sets production suggested that tested method gave 1,002 kg/rai of yield, 1.43 cm of diameter, 37,944 baht/rai of benefit and 3.89 of BCR. In addition, there were no disease incidence and no chemical residue in both production seasons. Technology transition to Fahuan sub-district, Khowang district, Yasothorn province, resulted that tested method and farmer method produced

[1] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 จ.อุบลราชธานี
Office of Agricultural Research and Development Region 4, Ubon Ratchathani
[2] สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
Plant Protection Research and Development Office , Department of Agriculture
[3] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรอำนาจเจริญ
Amnart-Chareon of Agricultural Research and Development Center

4,950 and 4,200 kg/rai of yields, 40,050 and 22,800 baht/rai of benefits, 3.06 and 1.83 of BCRs, and 1.50 and 3.00 % of disease incidences, respectively.

Key-words: shallot, twister disease (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc), IPM

บทคัดย่อ

การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงคุณภาพในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อย เพิ่มผลผลิต และเพิ่มคุณภาพ ดำเนินการระหว่างปี 2554-2557 ในพื้นที่ตำบลยางชุมน้อย อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ พบว่าวิธีทดสอบและวิธีเกษตรกร ให้ผลผลิตหอมปี (ปลูกในเดือนตุลาคม-มกราคม) เฉลี่ย 3,905 และ 3,170 กก./ไร่ ให้ผลตอบแทน 49,563 และ 31,045 บาท/ไร่ อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 2.95 และ 2.08 ตามลำดับ พบการเกิดโรค ร้อยละ 2.72 และ 25.64 ขนาดของหัวหอม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.44 และ 3.21 ซม. ตามลำดับ ส่วนการผลิตหอมพันธุ์ (ปลูกในเดือน เมษายน- พฤษภาคม) วิธีทดสอบ ให้ผลผลิตเฉลี่ย 979 กก./ไร่ ให้ผลตอบแทน 80,214 บาท/ไร่ ค่า BCR เท่ากับ 6.30 พบการเกิดโรคเฉลี่ยร้อยละ 3 ขนาดของหัวหอม มีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.35 ซม.ไม่พบสารพิษตกค้างในทุกกรรมวิธีการทดสอบเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์หอมแดงสะอาด ในพื้นที่ตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ พบว่าวิธีทดสอบและวิธีเกษตรกร ให้ผลผลิตเฉลี่ย 5,643 และ 4,580 กก./ไร่ ให้ผลตอบแทน 56,430 และ 45,800 บาท/ไร่ ค่า BCR เท่ากับ 2.70 และ 2.20 ตามลำดับ หัวหอมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.20 และ 2.80 ซม. ตามลำดับ ด้านการผลิตหอมพันธุ์ วิธีทดสอบ ให้ผลผลิตเฉลี่ย 1,002 กก./ไร่ ขนาดของหัวหอม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.43 ซม. ให้ผลตอบแทน 37,944 บาท/ไร่ อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน เท่ากับ 3.89 ไม่พบการเกิดโรคทั้งหอมปีและหอมพันธุ์ ไม่พบสารพิษตกค้างในทุกกรรมวิธีทั้งในการผลิตหอมปี และหอมพันธุ์ การขยายผลไปในพื้นที่ตำบลฟ้าห่วน อำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร พบว่า วิธีปรับปรุงและวิธีเกษตรกร ให้ผลผลิตเฉลี่ย 4,950 และ 4,200 กก./ไร่ ตามลำดับ ให้ผลตอบแทน 40,050 และ 22,800 บาท/ไร่ ตามลำดับ ค่า BCR เท่ากับ 3.06 และ 1.83 ตามลำดับ มีอัตราการเกิดโรคหอมเลื้อย ร้อยละ 1.5 และ 3.0 ตามลำดับ

คำหลัก : หอมแดง, โรคหอมเลื้อย, การป้องกันกำจัดแบบผสมผสาน หัวพันธุ์สะอาด

คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกหอมแดง 103,144 ไร่ ผลผลิตรวม 180,696 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 1,843 กก./ไร่ จังหวัดที่มีการปลูกหอมแดงมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดศรีสะเกษ พื้นที่ 24,972 ไร่ ผลผลิตรวม 46,623 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 2,094 กก./ไร่ รองมาคือจังหวัดพะเยา อุตรดิตถ์ ลำพูน เชียงใหม่ เพชรบูรณ์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) จังหวัดศรีสะเกษ เป็นแหล่งผลิตหอมแดงคุณภาพดี มีชื่อเสียงจนเรียกกันติดปากว่าหอมแดงศรีสะเกษ มีคุณลักษณะพิเศษ คือ เปลือกมีสีแดงเข้ม ด้านในมีสีม่วง กลิ่นฉุนแรง

เก็บรักษาได้ยาวนาน เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศที่นิยมอาหารไทย เช่น ยุโรป ญี่ปุ่น หอมแดงคุณภาพที่ส่งออกต้องมีลักษณะ เป็นหัวเดียว หรือหัวที่ยังไม่แยกออก ขนาดหัวจัมโบ้ (มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5-4.0 ซม. (เฉลี่ย 3.47 ซม.)) ผิวแห้งสนิทปราศจากโรคแมลง ขนาดหัวสม่ำเสมอ และปลอดภัยจากสารพิษ แหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ที่อำเภอยางชุมน้อย ขุขันธ์ ราษีไศล วังหิน และกันทรารมย์ ในการผลิตหอมแดงเกษตรกรพบการระบาดรุนแรงของโรคและแมลงศัตรูหอมได้แก่ หอมเลื้อย หรือแอนแทรกโนส หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยไฟ เกษตรกรมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมาก ในลักษณะผสมหลายชนิด รวมทั้งการใส่ปุ๋ยเคมีที่ยังไม่ถูกต้องทำให้ดินเสื่อมผลผลิตไม่มีคุณภาพและต้นทุนการผลิตสูง

การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงคุณภาพในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงคุณภาพและปลอดภัยจากสารพิษตกค้างที่เหมาะสมกับพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ โดยการนำเอาเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงที่พัฒนาขึ้นโดยกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง มาปรับใช้ในพื้นที่ ทั้งในด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชการปรับปรุงบำรุงดินให้เหมาะสมกับศักยภาพของพื้นที่ เพื่อเป็นแนวทางให้เกษตรกรใช้ในการปฏิบัติ ทำให้สามารถผลิตหอมแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ เมื่อได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมจะมีการขยายผลในวงกว้างสู่พื้นที่อื่นที่มีศักยภาพคล้ายคลึงกัน เป็นการแก้ปัญหาและพัฒนาระบบการผลิตหอมแดงให้มีคุณภาพสร้างโอกาสในการเข้าสู่ตลาดสินค้าคุณภาพ เกษตรกรมีความยั่งยืนในระบบการผลิต มีสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชที่ดี และช่วยลดผลกระทบเชิงลบต่อสิ่งแวดล้อม

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

พันธุ์พืช : พันธุ์หอมแดง ปุ๋ยอินทรีย์ : ปุ๋ยหมักมูลไก่ วัสดุปรับปรุงดิน : ปูนขาว ปุ๋ยเคมี : 15-15-15 สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช : สารโปรคลอราช สารแมนโคเซบ พิโปรนิล สารชีวินทรีย์ : เชื้อไตรโคเดอร์มา เชื้อบาซิลลัสทูรินเยนซีส วัสดุอื่น ๆ : ฟางข้าว

วิธีการ

ศึกษาวิจัยในสภาพพื้นที่เกษตรกรแบบเกษตรกรมีส่วนร่วม โดยใช้หลักการวิจัยระบบการทำฟาร์ม (Farming Systems Research) (อารันต์, 2532) ซึ่งมีแนวทางและขั้นตอนดำเนินการ 6 ขั้นตอน คือ การคัดเลือกพื้นที่เป้าหมาย (Selection of the Target Area) การวิเคราะห์พื้นที่ (Area Analysis) การวางแผนการวิจัย (Research Planning) ดำเนินการวิจัย (Experimentation) การประเมินผล (Assessment) และการขยายในวงกว้าง (Extrapolation / Extension)

การวางแผนการทดลอง

1. การทดลองที่ 1 การพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อยในหอมแดงในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ

ดำเนินการในพื้นที่เกษตรกร ตำบลยางชุมน้อย อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ ในระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 ดำเนินการทดสอบ 2 กรรมวิธี ร่วมกับเกษตรกรจำนวน 10 ราย รายละ 1 ไร่ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง ใช้เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อย การป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำ

กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร ไม่ใช้เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อย การป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการ ใส่ปุ๋ยโดยวิธีเกษตรกร

กิจกรรม	วิธีปรับปรุง	วิธีเกษตรกร
1. การเตรียมดิน	- เก็บเศษซากหอมแดงออกจากพื้นที่ปลูกเผาทำลาย -ไถตากดิน 2-3 ครั้ง เพื่อลดประชากรเชื้อรา ใส่ปูนโดโลไมค์ตามค่าวิเคราะห์ดิน -ใส่ปุ๋ยหมักรองพื้น อัตรา 500 กก. /ไร่	- การเตรียมแปลงปลูก ไถพรวน ไม่มีการเก็บเศษซาก -ใส่ปูนโดโลไมค์ อัตรา 100 กก. /ไร่
2. การเตรียมหัวพันธุ์	- แช่หัวพันธุ์หอมแดงด้วยเชื้อไตรโคเดอร์มาสด อัตรา 1 กก./น้ำ 200 ลิตร นาน 30 นาที ก่อนปลูก	- ไม่แช่หัวพันธุ์
3. การปลูก	- ปลูกหอมแดง ระยะ 16 x16 ซม.	- เหมือนกรรมวิธีที่ 1
4.การป้องกันกำจัดวัชพืช	-ฉีดพ่นสารคุมวัชพืชก่อนงอก ในกลุ่มออกซีฟูออเซ็น สารคุมวัชพืชก่อนงอก (อะลาคลอร์+ฟลูมิโอซาซิน) - คลุมฟางหลังปลูก	- เหมือนกรรมวิธีที่ 1
5.การใส่ปุ๋ย	- หลังปลูก 15 วันใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กก./ไร่ โดยวิธีหว่านให้ทั่วแปลง - หลังจากนั้น 15 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 25 กก./ไร่ โดยวิธีหว่านให้ทั่วแปลง	- หลังปลูก15 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 12-127 อัตรา 100 กก./ไร่ - หลังปลูก30 วัน ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 13 – 13-21 อัตรา 25 กก./ไร่ และสูตร 0 -10 – 30 อัตรา 25 กก./ไร่

5.การป้องกันกำจัดศัตรูพืช	-โรคหอมนอน/หอมเลื้อย ใช้เชื้อไตรโคเดอร์มาสด อัตรา 1 กก./น้ำ 200 ลิตร ฉีดพ่นหรือให้พร้อมกับการให้น้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้งในตอนเย็น หรือใช้สารโปรคลอราช 50 %WP อัตรา 20 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นสลับกับสารแมนโคเซบ 80 % WP อัตรา 40 - 50 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร -หนอนกระทู้หอมใช้เชื้อบาซิลลัสทูรินเยนซีส - เพลี้ยไฟใช้ ฟิโปรนิล	-โรคหอมนอน/หอมเลื้อย ใช้สารคาร์เบนดาซิม สารโปรคลอราช สารแมนโคเซบ -หนอนกระทู้หอมใช้สารเคมี อบาเมดติน ไซเพอร์เมทริน คลอไพริฟอส เมทโทมิล
6.การจัดการให้ได้คุณภาพ	- เด็ดดอกหอมในระยะแรกของการเจริญเติบโตเพื่อไม่ให้น้ำขังทำให้หัวเน่าและหอมมีลักษณะคอใหญ่ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด - เก็บเกี่ยวเมื่อหอมแดงอายุอย่างน้อย 80 วัน	

2. การทดลองที่ 2 การทดสอบเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์หอมแดงสะอาด

ดำเนินการในพื้นที่เกษตรกรตำบลหนองหมี อำเภอรายีไศล จังหวัดศรีสะเกษ ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2557 ดำเนินการทดสอบ 2 กรรมวิธี ร่วมกับเกษตรกรจำนวน 10 ราย รายละ 1 ไร่ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง ใช้เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อย การป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำ เทคโนโลยีที่ได้ผลแล้ว จากการทดสอบในพื้นที่อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ

กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร การป้องกันกำจัดศัตรูพืชและการ ใส่ปุ๋ยโดยวิธีเกษตรกร

3. การขยายในวงกว้าง (Extrapolation / Extension)

ในปี 2557 ขยายผลไปที่ ตำบลฟ้าห่วน อำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร โดยเปรียบเทียบวิธีทดสอบที่ได้จากการทดลองในจังหวัดศรีสะเกษกับวิธีเกษตรกร

4. การศึกษาการยอมรับเทคโนโลยีของเกษตรกร

โดยการสัมภาษณ์และสรุปร่วมกันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

การบันทึกข้อมูล

1. คุณสมบัติทางเคมีของดิน โดยเก็บตัวอย่างดินของเกษตรกรทุกรายก่อนเริ่มการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง โดยวิเคราะห์หาคุณสมบัติดิน คือ ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ความต้องการปูนปริมาณอินทรียวัตถุ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ ปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ เพื่อใช้ในการวางแผนการจัดการดินให้เหมาะสมกับการปลูกหอมแดงได้อย่างถูกต้องเหมาะสม

2. ผลผลิตหัวหอมโดยการสุ่มตัวอย่างประเมินผลผลิตในพื้นที่ 9 ตารางเมตร นำข้อมูลผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย

3. เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยสุ่มตัวอย่างประเมินการเกิดโรคในพื้นที่ 1 ตารางเมตร 3 จุด/กรรมวิธี นับจำนวนต้นทั้งหมดและต้นเป็นโรคเมื่ออายุ 60 วัน

4. ตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อยในหัวหอม ที่ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตรโดยใช้วิธีการตัดเนื้อเยื่อพืช (Tissue Transplanting Method)

5. การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง โดยสุ่มตัวอย่างผลผลิตในช่วงการเก็บผลผลิต ตัวอย่างละ 1 กก. นำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 โดยใช้วิธี Gas Chromatography (GC)

6. คุณภาพของผลผลิต วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหัวหอมหลังการเก็บเกี่ยว 15, 30 และ 60 วัน ด้วยเวอเนียร์คาร์ริบเปอร์ กรรมวิธีละ 10 หัว นำมาหาค่าเฉลี่ย

7. ผลตอบแทนด้านเศรษฐกิจ และอัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (Benefit Cost ratio; BCR)

$$\text{สูตรคำนวณค่า BCR} = \frac{\text{รายได้}}{\text{ต้นทุน}}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการเลือกพื้นที่เป้าหมาย และการวิเคราะห์พื้นที่ โดยสรุปได้คัดเลือกพื้นที่เกษตรกรในจังหวัดศรีสะเกษ คือ อำเภอยางชุมน้อย มีพื้นที่ปลูกหอมแดงรวม 11,910 ไร่ ปริมาณผลผลิตรวม 36,773 ตัน มูลค่า 1,103 ล้านบาท ผลผลิตเฉลี่ย 3,000 กก./ไร่ (สำนักงานเกษตรอำเภอยางชุมน้อย, 2552) อำเภอราษีไศล มีพื้นที่ปลูกหอมแดงรวม 14,368 ไร่ ปริมาณผลผลิตรวม 43,104 ตัน มูลค่า 1,293 ล้านบาท ผลผลิตเฉลี่ย 3,000 กก./ไร่ (สำนักงานเกษตรอำเภอราษีไศล. 2552) เกษตรกรปลูกหอมแดงโดยการปรับพื้นที่นาให้ให้มีระดับสูง น้ำไม่ท่วมขังหรือปลูกในบริเวณที่ดอน มีการนำดินจอมปลวกมาคลุกเคล้ากับดินปลูกทุก 2-3 ปี การปลูกเป็นแปลงใหญ่ 1-2 ไร่ ใน 2 ฤดูกาล ช่วงที่ 1 ปลูกในเดือนเมษายน-พฤษภาคม และช่วงที่ 2 ปลูกในเดือนตุลาคม-มกราคม มีการใช้พันธุ์จากอำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอลับแล อำเภอน้ำปาด จังหวัดอุตรดิตถ์ และอำเภอเมือง จังหวัดลำพูน ในปี 2552 เกษตรกรประสบปัญหาพบการระบาดรุนแรงของโรคหอมเลื้อย ครอบคลุมพื้นที่มากกว่าร้อยละ 90 ผลผลิตลดลงมากกว่าร้อยละ 50 และเน่าเสียง่ายเก็บไว้ไม่ได้นาน โรคและแมลงศัตรูหอมได้แก่ โรคหอมเลื้อย หรือแอนแทรกโนสที่เกิดจาก เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย เพลี้ยไฟ เกษตรกรมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมาก ในลักษณะผสมหลายชนิด รวมทั้งการใส่ปุ๋ยเคมีที่ยังไม่ถูกต้องทำให้ดินเสื่อม ผลผลิตไม่มีคุณภาพและต้นทุนการผลิตสูง ผลจากการวิเคราะห์ได้นำไปสู่การวางแผนแบบมีส่วนร่วมในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตหอมแดงในลำดับต่อไป

ผลการทดลองที่ 1 การพัฒนาเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อยในหอมแดงในพื้นที่จังหวัดศรีสะเกษ

1. ด้านเกษตรศาสตร์

1.1 ผลผลิต

กรรมที่ 1 วิธีปรับปรุง การผลิตหอมปี (ปลูกในเดือนตุลาคม-มกราคม) ให้ผลผลิตเฉลี่ย 3,905 กก./ไร่ การผลิตหอมพันธุ์ (ปลูกในเดือน เมษายน- พฤษภาคม) ให้ผลผลิตเฉลี่ย 979 กก./ไร่ กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร หอมปีให้ผลผลิตเฉลี่ย 3,170 กก./ไร่ ซึ่งต่ำกว่าวิธีปรับปรุง 735 กก./ไร่ (Table 1-2)

1.2 ร้อยละการเกิดโรค

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง การผลิตหอมปี พบการเกิดโรคเฉลี่ย ร้อยละ 2.72 การผลิตหอมพันธุ์พบการเกิดโรคเฉลี่ย ร้อยละ 3 กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร การผลิตหอมปีพบการเกิดโรคเฉลี่ย ร้อยละ 25.64 ซึ่งสูงกว่าวิธีปรับปรุง ร้อยละ 22.92 (Table 1-2)

1.3 ผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

ผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลผลิต การผลิตหอมปี และหอมพันธุ์ไม่พบสารพิษตกค้างในกลุ่ม Pyrethroid group (PY) Organophosphates group (OP) Organochlorine group ร้อยละ 100 ในผลผลิตหอมแดงทุกกรรมวิธี เนื่องจากเกษตรกรหยุดการใช้สารเคมีก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 20-30 วัน (Table 1-2)

1.4 คุณภาพของผลผลิต

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง การผลิตหอมปี หัวหอมแดงหลังการแขวน 15 วัน (พร้อมจำหน่าย) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย 3.43 ซม. ซึ่งอยู่ในคุณภาพระดับ 1 การผลิตหอมพันธุ์ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย 1.35 ซม.

กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 3.21 ซม.ซึ่งอยู่ในคุณภาพระดับ 1 แต่มีขนาดเล็กว่าหัวหอมในวิธีปรับปรุง (Table 1-2)

1.5 คุณสมบัติดินของแปลงทดสอบ

ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุในดินอยู่ที่ 0.89 ซึ่งอยู่ในระดับต่ำ ค่า pH ของดินแปลงทดสอบเท่ากับ 6.67 ซึ่งเป็นระดับกรดเล็กน้อย ซึ่ง pH ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของหอมเท่ากับ 6 - 6.5 จึงไม่มีความจำเป็นต้องมีการใส่ปูน ปริมาณไนโตรเจนในดินแปลงทดสอบอยู่ที่ 0.045 ซึ่งอยู่ในระดับต่ำ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินแปลงทดสอบ อยู่ที่ 273 ppm ซึ่งอยู่ในระสูงมาก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในแปลงทดลองยังมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดิน เท่ากับ 488 ppm และ 404 ppm ในกรรมวิธีปรับปรุงและวิธีเกษตรกรตามลำดับ ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในดิน แปลงทดสอบ อยู่ที่ 109 ppm ซึ่งอยู่ในระดับสูง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในแปลงทดสอบยังมีปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในดินอยู่เท่ากับ 138 ppm และ 109 ppm (Table 3) ควรมีการ

เพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุลงไปในดินเพื่อช่วยควบคุมปฏิกิริยาของดิน ช่วยในการส่งเสริมประสิทธิภาพของการใช้ปุ๋ยเคมี และมีการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ทำให้ดินเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของหอม

2. ด้านเศรษฐศาสตร์

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง การผลิตหอมปี เฉลี่ย 2 ปี ต้นทุนผันแปร 25,883 บาท/ไร่ รายได้ 75,447 บาท/ไร่ ผลตอบแทนเหนือต้นทุนผันแปร 49,821 บาท/ไร่ อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 2.95 ให้ผลตอบแทนสูงสุดสามารถดำเนินการผลิตได้ การผลิตหอมพันธุ์ เฉลี่ย 2 ปี ต้นทุนผันแปร17,636 บาท/ไร่ รายได้ 97,850 บาท/ไร่ ผลตอบแทนเหนือต้นทุนผันแปร 80,214 บาท/ไร่ อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 6.3 ให้ผลตอบแทนสูงสามารถดำเนินการผลิตได้ (Table 1-2)

กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร การผลิตหอมปี เฉลี่ย 2 ปี ต้นทุนผันแปร 28,834 บาท/ไร่ รายได้ 59,880 บาท/ไร่ ผลตอบแทนเหนือต้นทุนผันแปร 31,045 บาท/ไร่ อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 2.08 ควรเลือกกรรมวิธีที่ 1 ซึ่งให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า (Table 1) ต้นทุนผันแปรของวิธีเกษตรกรสูงกว่าวิธีปรับปรุง เป็นค่าปุ๋ยเคมีและค่าสารเคมี

การทดลองที่ 2 การทดสอบเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์หอมแดงสะอาด

1. ด้านเกษตรศาสตร์

1.1 ผลผลิต

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง การผลิตหอมปี (ปลูกในเดือนตุลาคม-มกราคม) ให้ผลผลิตเฉลี่ย 5,643 กก./ไร่ การผลิตหอมพันธุ์ (ปลูกในเดือน เมษายน- พฤษภาคม) ให้ผลผลิตเฉลี่ย 1,002 กก./ไร่ กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร การผลิตหอมปี ให้ผลผลิต 4,580 กก./ไร่ (Table 4-5)

1. 2 การเกิดโรค

การผลิตหอมปี วิธีปรับปรุงและวิธีเกษตรกร ไม่พบการเกิดโรค ส่วนการผลิตหอมพันธุ์ไม่พบการเกิดโรคเช่นกัน (Table 4-5)

1.3 การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อยในหัวหอม

ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย ในหัวพันธุ์หอมแดง ตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย แต่พบเชื้อ *Aspergillus* sp. ทุกราย (Table 6) ในผลผลิตหอมแดง (หอมปี) หลังเก็บเกี่ยวไม่พบเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย แต่พบ *Aspergillus* sp. *Penicillium sp*. จำนวน 7 ราย พบเชื้อ *Aspergillus* sp. จำนวน 4 ราย ซึ่งเชื้อ *Aspergillus* sp. เป็นเชื้อสาเหตุโรคราดำ เกิดขึ้นหลังการเก็บเกี่ยว พบเชื้อ *Fusarium* sp. จำนวน 1 ราย (Table 4) จากผลการตรวจวินิจฉัยโรคไม่พบเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย (*Colletotrichum* spp.) แสดงให้เห็นว่าหัวพันธุ์หอมแดงจากพื้นที่ทำการทดลองมีความปลอดภัยจากโรคหอมเลื้อย เนื่องจากโรคหอมเลื้อยเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc สามารถติดต่อไปกับหัวพันธุ์ได้ แต่ต้องมีการปฏิบัติดูแลรักษา ระวังการแพร่ระบาดของโรค เนื่องจาก

โรคดังกล่าวสามารถแพร่ระบาดโดยสปอร์ของเชื้อราแพร่ไปกับลม ฝน น้ำ แมลง เครื่องมือการเกษตร (กรมวิชาการเกษตร, 2552) ไม่ควรนำหัวพันธุ์จากแปลงนี้ไปใช้ทำพันธุ์ เกษตรกรได้นำพันธุ์จากหอมปีไปปลูกเป็นหอมพันธุ์ช่วงเดือน เมษายน-พฤษภาคม พบว่าไม่พบเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อยเช่นกัน

1.4 การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

ผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลผลิต การผลิตหอมปีและหอมพันธุ์ ไม่พบสารพิษตกค้างในกลุ่มPyrethroid group (PY) Organophosphates group (OP) Organochlorine group ร้อยละ 100 ในผลผลิตหอมแดงทุกกรรมวิธี เนื่องจากเกษตรกรหยุดการใช้สารเคมีก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 20-30 วัน (Table 4-5)

1.5 คุณภาพของผลผลิต

คุณภาพของผลผลิต การผลิตหอมปี วิธีปรับปรุง หัวหอมแดงหลังการแขวน 15 วัน (พร้อมจำหน่าย) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย 3.44 ซม. ซึ่งอยู่ในคุณภาพระดับ 1 วิธีเกษตรกร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 3.10 ซม. ซึ่งอยู่ในคุณภาพระดับ 1 แต่มีขนาดเล็กว่าหัวหอมในวิธีปรับปรุง การผลิตหอมพันธุ์ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง เฉลี่ย 1.43 ซม. เนื่องจากมีอายุเก็บเกี่ยวสั้น ประมาณ 45 วัน เพื่อไว้ทำพันธุ์ (Table 4-5)

1.6 คุณสมบัติดินของแปลงทดสอบ

ดินมีปริมาณอินทรียวัตถุในดินแปลงทดสอบอยู่ที่ 0.97-1.49 ซึ่งอยู่ในระดับต่ำค่า pH ของดินแปลงทดสอบเท่ากับ 6.87 ซึ่งเป็นระดับกรดเล็กน้อย ซึ่ง pH ที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของหอมเท่ากับ 6-6.5 จึงไม่มีความจำเป็นต้องมีการใส่ปูน ปริมาณไนโตรเจนในดินแปลงทดสอบวิธีปรับปรุงและวิธีเกษตรกรอยู่ที่ 0.08 และ 0.05 ซึ่งอยู่ในระดับต่ำ ปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินแปลงทดสอบกรรมวิธีปรับปรุง และในวิธีเกษตรกร อยู่ที่ 300.23 ppm และ 216 ppm ซึ่งอยู่ในระดับสูงมาก เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในแปลงทดลอง ยังมีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ในดินเท่ากับ 272 ppm และ 284 ppm ในกรรมวิธีปรับปรุงและวิธีเกษตรกร ปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในดิน แปลงทดสอบ วิธีปรับปรุง และวิธีเกษตรกรอยู่ที่ 169 ppm และ 72 ppm ซึ่งอยู่ในระดับสูง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในแปลงทดสอบยังมีปริมาณโพแทสเซียมที่เป็นประโยชน์ในดินอยู่เท่ากับ 210 ppm และ 175 ppm (Table 7) ควรมีการเพิ่มปริมาณอินทรียวัตถุลงไปในดินเพื่อช่วยควบคุมปฏิกิริยาของดิน ช่วยในการส่งเสริมประสิทธิภาพของการใช้ปุ๋ยเคมี และมีการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ทำให้ดินเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของหอม

2. ด้านเศรษฐศาสตร์

กรรมวิธีที่ 1 วิธีปรับปรุง การผลิตหอมปีใช้ต้นทุนการผลิต 20,900 บาท/ไร่ ต่ำกว่าวิธีเกษตรกร 574 บาท คิดเป็นร้อยละ 3 ให้ค่าตอบแทนเหนือต้นทุนผันแปรเท่ากับ 35,529 บาท/ไร่ อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 2.95 สูงกว่าวิธีเกษตรกร การผลิตหอมพันธุ์ใช้ต้นทุนการผลิต 14,513 บาท/ไร่ ให้ค่าตอบแทนเหนือต้นทุนผันแปรเท่ากับ 37,944 บาท/ไร่

อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 3.89 กรรมวิธีที่ 2 วิธีเกษตรกร การผลิตหอมปีใช้ต้นทุนการผลิต 20,326 บาท/ไร่ ให้ค่าตอบแทนเหนือต้นทุนผันแปรเท่ากับ 25,475 บาท/ไร่ ซึ่งต่ำกว่าวิธีปรับปรุง เท่ากับ 10,054 บาท/ไร่ คิดเป็นร้อยละ 28 อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 2.08 ควรนำรูปแบบการผลิตโดยวิธีการปรับปรุงไปใช้ในการผลิต (Table 4-5)

การขยายในวงกว้าง (Extrapolation / Extension)

ในปี 2557 ขยายผลไปที่ ตำบลฟ้าห่วน อำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร ซึ่งเกษตรกรประสบปัญหาการระบาดของโรคหอมเลื้อย เป็นพื้นที่ที่มีศักยภาพคล้ายคลึงกัน โดยมีวัตถุประสงค์ในการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อย ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพตรงกับความต้องการของตลาดโดยนำเทคโนโลยี และพันธุ์หอมแดงจาก ตำบลหนองหมี อำเภอรายีไสล จังหวัดศรีสะเกษ ไปใช้ในการผลิต พบว่าผลผลิตหอมปี ตำบลฟ้าห่วน อำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร จากวิธีทดสอบและวิธีเกษตรกรให้ผลผลิต 4,950 และ 4,200 กก./ไร่ ตามลำดับ สูงกว่าวิธีเกษตรกรร้อยละ 18 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางหัว (ขนาดหัว) ใกล้เคียงกันคือ 3.44 และ 3.20 ซม. ตามลำดับ การเกิดโรคหอมเลื้อย วิธีทดสอบ และวิธีเกษตรกร มีอัตราการเกิดโรคหอมเลื้อยเท่ากับ ร้อยละ 1.5 และ 3.0 ตามลำดับ วิธีทดสอบสามารถลดโรคหอมเลื้อยได้ ร้อยละ 1.5 ต้นทุนและผลตอบแทน วิธีทดสอบและวิธีเกษตรกร มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 19,350 และ 27,600 บาท/ไร่ ตามลำดับ วิธีทดสอบมีต้นทุนต่ำกว่าวิธีเกษตรกร ร้อยละ 42.64 ต้นทุนวิธีเกษตรกรสูงกว่าวิธีทดสอบมาจากค่าปุ๋ยเคมีและสารเคมี ผลตอบแทน พบว่าวิธีทดสอบและวิธีเกษตรกร ให้ผลตอบแทน 39,650 และ 22,800 บาท/ไร่ ตามลำดับ สูงกว่าวิธีเกษตรกรร้อยละ 73.90 อัตราส่วนของรายได้ต่อการลงทุน (BCR) วิธีทดสอบ และวิธีเกษตรกร เท่ากับ 3.06 และ 1.83 ตามลำดับ (Table 8) เทคโนโลยีที่นำไปใช้สามารถแก้ปัญหาโรคหอมเลื้อยได้และเกษตรกรมีการยอมรับเทคโนโลยี

การศึกษาการยอมรับเทคโนโลยี

1. เทคโนโลยีที่เกษตรกรยอมรับ

1.1 การใส่ปุ๋ยหมักผสมเชื้อไตรโคเดอร์มารองพื้นก่อนปลูก อัตรา 250 กก./ไร่ และการใช้เชื้อไตรโคเดอร์มาสดอัตรา 1 กก./น้ำ 200 ลิตร ฉีดพ่นหรือให้พร้อมกับการให้น้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้งในตอนเย็น

1.2 การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย ในหัวพันธุ์หอมแดง ทำให้มั่นใจในการช่วยป้องกันการระบาดของโรคหอมเลื้อย และโรคอื่น ๆ ที่ติดมากับหัวพันธุ์

1.3 การใช้เชื้อบาซิลลัสทูรินเยนซีส ในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม และการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคและศัตรูหอมแดงตามคำแนะนำ

1.4 การใส่ปูนขาวตามค่าวิเคราะห์ดินและใส่ก่อนการปลูกหอมแดงอย่างน้อย 2 สัปดาห์ จากเดิมไม่เคยมีการวิเคราะห์คุณสมบัติดินและหว่านปูนขาวในวันปลูกหอมแดง ซึ่งเป็นการปฏิบัติที่ไม่ถูกต้องตามคำแนะนำ

1.5 การปรับปรุงบำรุงดินตามคำแนะนำ เนื่องจากเกษตรกรรู้คุณสมบัติดินจากการวิเคราะห์

2. เทคโนโลยีที่เกษตรกรไม่ยอมรับ

การแช่หัวพันธุ์หอมแดงด้วยเชื้อไตรโคเดอร์มาสดอัตรา 1 กก./น้ำ 200 ลิตร ก่อนปลูกเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อยที่ติดมากับหัวพันธุ์ในการปลูกหอมปี เนื่องจากเมื่อแช่หัวพันธุ์แล้วไม่ได้ปลูกหรือปลูกไม่หมด หัวพันธุ์จะแตกยอดและรากทำให้ปลูกยาก เมื่อนำไปปลูกรากและยอดจะหัก ควรใช้ในการเตรียมหัวพันธุ์สำหรับการปลูกหอมพันธุ์

สรุปผลการทดลอง

1. การป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อยในหอมแดงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc ตามคำแนะนำด้วยการทำลายต้นพืชที่เป็นโรคด้วยการถอนไปเผาทิ้งและใช้เชื้อไตรโครเดอร์มาและสารเคมีตามคำแนะ โดยใช้สารเคมีแมนโคเซบฉีดพ่นสลับกับ โพรคลอราช (กรมวิชาการเกษตร ,2552) ทำให้ลดการระบาดของโรคได้ ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย ในหัวพันธุ์หอมแดง และในหอมปีตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรคหอมเลื้อย การใช้เชื้อราไตรโครเดอร์มาสดแช่และฉีดพ่นหอมแดงทำให้การเจริญของเชื้อราไตรโครเดอร์เข้าสู่ภายในเส้นใยของเอราไรซอคโทเนีย ทำให้เส้นใยสูญเสียความมีชีวิต การทำลายในลักษณะปรสิตของเชื้อสาเหตุโรคจำพวก *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc (จิระเดชและวรรณวิไล,2546)

2. การป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อยในหอมแดงที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc ตามคำแนะนำในวิธีปรับปรุง พบการเกิดโรค ต่ำกว่าในวิธีเกษตรกร จึงควรนำไปใช้เป็นคำแนะนำการป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อยในหอมแดงให้กับเกษตรกรผู้ปลูกหอมแดง

3. การผลิตหอมแดงใช้เทคโนโลยีตามคำแนะนำทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ หัวหอมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 3.43 ซม. ซึ่งอยู่ในคุณภาพระดับ 1

4. การผลิตหอมปี และหอมพันธุ์ ผลการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผลผลิตหอมแดงไม่พบสารพิษตกค้างในกลุ่ม Pyrethroid group (PY) Organophosphates group (OP) Organochlorine group ร้อยละ 100 ในผลผลิตหอมแดงทุกกรรมวิธี เนื่องจากเกษตรกรใช้สารตามตามคำแนะนำและหยุดการใช้สารเคมีก่อนการเก็บเกี่ยวประมาณ 20 วัน

5. เกษตรกรควรผลิตพันธุ์หอมแดงใช้เองหรือนำมาจากแหล่งผลิตหัวพันธุ์ที่มีการควบคุมโรคเพื่อป้องกันโรคที่ติดมากับหัวพันธุ์ เนื่องจากโรคหอมเลื้อยเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc สามารถติดต่อไปกับหัวพันธุ์ได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

6. การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติดินทำให้สามารถจัดการดินให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของพืช การปรับปรุงบำรุงดินโดยการปลูกพืชตระกูลถั่วบำรุงดิน การใช้ปูน การใช้ปุ๋ยเคมีได้อย่างถูกต้องเหมาะสมทำให้ดินอุดมสมบูรณ์ ป้องกันดินเสื่อม ช่วยลดการระบาดของโรคหอมเลื้อยลงได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2552) และยังช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้จึงควรให้ความสำคัญ

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

1. ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรร่วมโครงการ การผลิตหอมแดงคุณภาพในพื้นที่อำเภอยางชุมน้อย ณ ห้องประชุมโรงเรียนเทศบาลยางชุมน้อย จำนวน 700 คน ในปี 2555โดยเทศบาลยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ

2. ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรร่วมโครงการวิจัยและพัฒนาเพื่อยกระดับการผลิตการเก็บรักษาและการตลาดหอมแดงแบบครบวงจร เจ้าหน้าที่ของ อบต. ในพื้นที่อำเภอยางชุมน้อย ราษีไศล วังหิน อุทุมพรพิสัย และอำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ ณ ห้องประชุมองค์การบริหารส่วนตำบลละทาย อำเภอกันทรารมย์ และห้องประชุมองค์การบริหารส่วนตำบลส้มป่อย อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 450 คน ในปี 2556โดยศูนย์บริการวิชาการแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรผู้ปลูกหอมแดง ตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ ณ ห้องประชุมองค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 100 คน ในปี 2556โดย องค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี

4. ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรผู้ปลูกหอมแดง ตำบลฟ้าห่วน อำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร ณ ศาลาวัดบ้านแข้ ตำบลฟ้าห่วน อำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร เมื่อวันที่ 15 มีนาคม 2556 มีเกษตรกรเข้ารับการอบรมจำนวน 100 คน โดยสำนักงานเกษตรอำเภออำเภอค้อวัง จังหวัดยโสธร

5. ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรผู้ปลูกหอมแดง ตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ ณ ห้องประชุมองค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 100 ราย ในปี 2557โดย องค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี

6. จัดงานวันถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์หอมแดงสะอาดเพื่อนำสู่การผลิตหอมแดงที่มีคุณภาพจังหวัดศรีสะเกษ ผู้ร่วมงานประกอบด้วย เกษตรกร เจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาและส่งเสริมการเกษตร ภาคเอกชน ผู้ประกอบการ จำนวน 500 คน เมื่อวันพฤหัสบดีที่ 8 มกราคม 2557 ณ บ้านหนองหมี ตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ โดยองค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี ร่วมกับสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 สำนักงานเกษตรอำเภอราษีไศล สำนักงานเกษตรจังหวัดศรีสะเกษ

7. รายการก้าวไกลกรมวิชาการเกษตร เรื่อง เทคโนโลยีการผลิตหอมแดงพันธุ์สะอาด ออกอากาศเมื่อวันอาทิตย์ที่ 11 มกราคม 2558 สถานีวิทยุโทรทัศน์ อสมท. เวลา 05.00-05.25 น. ทางช่อง 9 โมเดิร์นไนท์ทีวี

8.ได้เกษตรกรต้นแบบจากกลุ่มเกษตรกรร่วมโครงการ ที่สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตหอมแดงคุณภาพ การป้องกันกำจัดโรคหอมเลื้อย การผลิตหอมแดงพันธุ์สะอาด การใช้สารเคมีถูกต้องเหมาะสมตามหลักวิชาการ การปรับปรุงบำรุงดินตามคำแนะนำให้กับเกษตรกรในพื้นที่และหมู่บ้านใกล้เคียงจำนวน 30 คน

9. เกษตรกรร่วมโครงการ จำนวน 10 ราย สามารถผลิตหัวพันธุ์หอมแดงสะอาด ในพื้นที่ 20 ไร่ ได้พันธุ์หอมแดงสะอาด อย่างน้อย 20 ตัน ซึ่งใช้ปลูกได้ 200 ไร่ ได้ผลผลิตหอมแดงพันธุ์สะอาด ประมาณ 1,000 ตัน มูลค่า 20 ล้านบาท ใช้ปลูกได้พื้นที่ 3,000 ไร่ ได้ผลผลิตหอมแดงคุณภาพ (หอมปี) จำนวน 15,000 ตัน มูลค่า 300 ล้านบาท ในปี 2558

10. เกษตรกรร่วมโครงการได้รับการรับรองแหล่งผลิตพืช GAP หอมแดง จำนวน 30 คน

คำขอบคุณ

1. ขอขอบคุณสำนักงานเกษตรจังหวัดศรีสะเกษ สำนักงานเกษตรอำเภอยางชุมน้อย เทศบาลตำบลยางชุมน้อย อำเภอยางชุมน้อย สำนักงานเกษตรอำเภอราษีไศล องค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ สำนักงานเกษตรอำเภอคำเขื่อนแก้ว จังหวัดยโสธร ที่ให้ข้อมูลทั่วไปของพื้นที่และข้อมูลการผลิตหอมแดง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ และวางแผนการวิจัย

2. ขอขอบคุณ องค์การบริหารส่วนตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ ผู้นำชุมชน และเกษตรกรในพื้นที่ ซึ่งได้ร่วมกันจัดงานวันถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์หอมแดงสะอาดเพื่อนำสู่การผลิตหอมแดงที่มีคุณภาพจังหวัดศรีสะเกษ และเกษตรกรร่วมโครงการ ซึ่งทำหน้าที่เป็นวิทยากรถ่ายทอดความรู้ในการผลิตหอมแดงพันธุ์สะอาดให้กับเกษตรกรและผู้มาร่วมงาน เมื่อวันพฤหัสบดีที่ 8 มกราคม 2558 ณ บ้านหนองหมี ตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ

3. ขอขอบคุณ นายจำลอง กกรัมย์ ผอ.ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี และนายธัชธาวินท์ สะรุโณ รักษาการผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง (สวพ.8) ที่ให้คำแนะนำในการจัดทำรายงานผลงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2540. เอกสารคำแนะนำที่ 28 เรื่องหอมแดง. พิมพ์ครั้งที่ 2. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. 29 หน้า.

กรมพัฒนาที่ดิน. 2540. การจัดการดินและพืชเพื่อปรับปรุงบำรุงดินอินทรีย์ต่ำ. กรมพัฒนาที่ดิน กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2545. เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับ หอมหัวใหญ่และหอมแบ่ง. ISBN 974-436-022-4 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร. 29 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2553. คำแนะนำการใช้ปุ๋ยกับพืชเศรษฐกิจ.กลุ่มวิจัยปฐพีวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 122 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2552. คู่มือโรคผัก. ISBN 978-974-436-708-2.สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 153 หน้า.

จิระเดช แจ่มสว่าง และวรรณวิไล อินทรธนู. 2546. การควบคุมโรคพืชด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์ม่าใน เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชโดยวิธีชีววิธี วันที่ 18-20. สิงหาคม 2546 ณ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม. 62 หน้า.

สนั่น รัตนานุกุล ประเสริฐ หนูจีน ศักดิ์ชาย วรามิตรและเบลเยี่ยม เจริญพานิช. 2530. การศึกษาระยะเวลาและวิธีการใส่ปุ๋ยที่เหมาะสมสำหรับหอมแดง รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2530 ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ หน้า 71-80.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2552 ศูนย์สารสนเทศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 175 หน้า .

สำนักงานเกษตรอำเภอยางชุมน้อย. 2552. แผนพัฒนาการเกษตรชุมชนตำบลยางชุมน้อย อำเภอยางชุมน้อย จังหวัดศรีสะเกษ. เอกสารวิชาการ. 48 หน้า .

สำนักงานเกษตรอำเภอราษีไศล . 2552. แผนพัฒนาการเกษตรชุมชนตำบลหนองหมี อำเภอราษีไศล จังหวัดศรีสะเกษ. เอกสารวิชาการ. 62 หน้า .

อารันต์ พัฒโนทัย. 2535. หลักการและขั้นตอนของงานวิจัยและทดสอบในไร่นาเกษตรกร. คำบรรยายในการอบรมเรื่องการประสานงานเพื่อการวิจัยและพัฒนาในระดับไร่นาของกรมวิชาการเกษตร ณ สถานีทดลองพืชไร่พิษณุโลก วันที่ 9-11 พฤษภาคม 2535. 51 หน้า .

Table 1 Shallot yields, cost, incomes, benefits, benefit cost ratio and twister disease damage on farmers shallot at Yarngshum-noi District Amphure Yangshum-noi Srisaket Province in October-January 2011-2012 (means of 10 fields)

Yield and economic return	recommended method			conventional method		
	2011	2012	average	2011	2012	average
Yield (kg/rai)	3,750	4,060	3,905	2,740	3,600	3,170
diameter (cm)	3.44	3.43	3.43	3.18	3.25	3.21
twister disease (%)	0.15	5.30	2.72	20.04	31.25	25.64
cost (baht/rai)	24,396	27,371	25,885	27,735	29.934	28,835
cost (baht/kg)	6.5	6.7	6.6	10.1	8.3	9.2
price (baht/kg)	24	15	19.5	24	15	19.5
income (baht/rai)	89,994	60,900	75,447	65,760	54,000	59,880
profit (baht/rai)	66,113	33,529	49,563	38,025	24,066	31,045
Benefit Cost Ratio	3.68	2.22	2.91	2.37	1.8	2.08
chemical residues	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 2 Shallot yields, cost, incomes, benefits, benefit cost ratio and twister disease damage on farmers shallot at Yarngshum-noi District Srisaket Province in April-May 2011-2012 (means of 10 fields)

Yield and economic return	recommended method		
	2011	2012	Average
yield(kg./rai)	1,170	787	979
diameter (mm)	1.4	13.2	13.5
twister disease (%)	5	0.9	3
cost (baht/rai)	25,289	9,783	17,636
cost (baht/kg)	21	12	17
price (baht/kg)	100	100	100
income (baht/rai)	117,000	78,700	97,850
profit (baht/rai)	91,511	68,917	80,214
Benefit Cost Ratio	4.6	8.04	6.3
chemical residues	ND	ND	ND

Table 3 Soil fertility before testing and after on shallot farm at Tumbon Yarngshum-noi Yangshum-noi District Srisaket province in 2011-2012

Soil fertility	recommended method			conventional method		
	before	after	change	before	after	change
pH	6.67	5.98.	-0.69	6.67	6.06	-0.61
LR (kg/rai)	0	191	+191	0	111	+111
O M (%)	0.89	0.79	-0.10	0.89	0.93	+0.04
N (%)	0.045	0.04	+0.05	0.045	0.04	+0.04
Avai.P(mg/kg)	273	488	+215	273	404	+131
Exch.K (mg/kg)	109	138	+29	109	91	18

Laboratory of Office of Agricultural Research and Development Region 4

Table 4 Shallot yields, cost, incomes, benefits, benefit cost ratio and twister disease damage on farmers at Tumbon Nong Mhee Rasi Salai District Sisaket province in October-January 2013-2014 (means of 10 fields)

Yield and economic return	recommended method			conventional method		
	2013	2014	Ave	2013	2014	Ave
yield(kg./rai)	6,515	4,771	5,643	5,920	3,240	4,580
diameter (cm)	3.19	3.20	3.20	2.95	2.70	2.80
twister disease (%)	0	0	0	0	0	0
cost (baht/rai)	24,115	17,684	20,900	22,430	18,221	20,326
cost (baht/kg)	3.7	3.7	3.7	3.78	5.62	4.7
price (baht/kg)	10	10	10	10	10	10
income (baht/rai)	65,150	47710	56,430	59,200	32,400	45,800
profit (baht/rai)	41,035	30,023	35,529	36,770	14,179	25,475
Benefit Cost Ratio	2.70	2.69	2.7	2.63	1.77	2.20
chemical residues	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table 5 Shallot yields, cost, incomes, benefits, benefit cost ratio and twister disease damage on farmers shallot at Rasrisalai District Srisaket Province in April-May 2013-2014 (means of 10 fields)

Yield and economic return	recommended method		
	2013	2014	average
yield(kg./rai)	900	1,103	1,002
diameter (cm)	1.46	1.40	1.43
twister disease (%)	0	0	0
cost (baht/rai)	11,751	17,275	14,513
cost (baht/kg)	13	15	14
price (baht/kg)	70	38	54
income (baht/rai)	63,000	41,914	52,457
profit (baht/rai)	51,249	24,639	37,944
Benefit Cost Ratio	5.36	2.42	3.89
chemical residues	ND	ND	ND

Table 6 Diagnosis of the rhizome shallots to plant a sweet year in April-May 2013 Assessment of twister disease in shallot plant and Diagnosis of the shallot harvest in Octerber-January in 2013-2014 at . Tumbon Nong Mhee Rasi Salai District Sisaket province

Farmer name	Diagnosis of the rhizome shallots (1)	Assessment of twister disease in shallot plant (2)	Diagnosis of the shallot harvest (3)
Mr.Sombat Narmcharoen	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.
Mr. Pai Galaget	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp. P*enicillium* sp,unknown
Mr.Wicheon Therapan	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.
Mr. Chumnan Nillapai	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.
Mr.Utai Galaget	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus sp., Penicillium sp.*
Mrs. Urai Jaidee	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus sp., Penicillium sp.*
Mr. Wanchai Ornsri	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus sp., Penicillium sp,unknown*
Mr. Jai warapode	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.,*Fusarium* sp.
Mr.Suriyan Jitmun	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.,*Penicillium* sp.,unknown
Mr. Tiumsak Bussabong	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.,unknown
Mr.Wart Thonapan	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus sp., Penicillium sp.*
Mr. Sawat Turnpai	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.,unknown
Mr. Sompong Srihawong	*Aspergillus* sp.	Not detect	*Aspergillus* sp.

Laboratory of Plant Protection Research and Development Office DOA

(1) Diagnosis of the rhizome shallots to plant a sweet year in April-May 2013

(2) Assessment of twister disease in shallot plant (onion years) in October-January 2013-2014

(3) Diagnosis of the shallot harvest in October-January 2013-21

Table 7 Soil fertility before testing and after on shallot farm at Tumbon Nong Mhee Rasi Salai District Sisaket province in Octerber-January 2013-2014

Soil fertility	recommended method			conventional method		
	before	after	change	before	after	change
pH	6.87	6.37	-0.5	5.29	5.38	+0.09
LR (kg/rai)	0	26.4	+26.4	445	234	-211
O M (%)	1.49	1.13	-0.36	0.97	1.44	+0.47
N (%)	0.08	0.06	-0.02	0.05	0.07	+0.02
Avai.P(mg/kg)	300.23	272.91	-27.32	216.00	284.00	+68
Exch.K (mg/kg)	169.11	210.19	+41.08	72.00	175.00	+103

Laboratory of Office of Agricultural Research and Development Region 4

Table 8 Shallot yields, cost, incomes, benefits, benefit cost ratio and twister disease damage on farmers at Khae village Tumbon Fahuan Koawang District Yasoton Province in March- December 2014 (means of 6 fields)

Yield and economic return	recommended method	conventional method
yield(kg./rai)	4,950	4,200
diameter (mm)	34.5	32.0
twister disease (%)	1.5	3.0
cost (baht/rai)	19,350	27,600
cost (baht/kg)	3.9	6.57
price (baht/kg)	12	12
income (baht/rai)	59,400	50,400
profit (baht/rai)	40,050	22,800
Benefit Cost Ratio	3.06	1.83



Figure 1 Onion production potential and problem analyses with farmers in Yang Chum Noi and RasiSalai districts which facing onion twister disease



Figure 2 Planting area preparation by cleaning residues, liming, soil drying, basal organic fertilizer and *Trichoderma* applications, and covering with rice straw after planting



Figure 3 Experimental plots, harvesting, drying and storage methods



Figure 4 Training farmers in Yang Chum Noi district, Sri Saket province and Khowang district, Yasothorn province



Figure 5 A field day event on Sri Saket quality onion production technology transfer was conducted on January 8, 2015 at NongMee sub-district, RasiSalai district, Sri Saket province.



Figure 6 Sombut Namchareon and WichienTherapan, model farmers on clean onion variety production of NongMee sub-district, RasiSalai district, Sri Saket province

เทคโนโลยีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชาเพื่อผลิตชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง

Processing Technology for Steaming Green Tea and Black Tea

สมพล นิลเวศน์ [1/] ฉัตต์นภา ข่มอาวุธ [2/] เกรียงศักดิ์ นักผูก [3/]
จำรอง ดาวเรือง [4/] สมคิด รัตนบุรี [2/] อุทัย นพคุณวงศ์ [5/] อนันต์ ปัญญาเพิ่ม [2/]
ปิยนุช นาคะ [4/] สุภัทรา เลิศวัฒนเกียรติ [4/] นงคราญ โชติอิ่มอุดม [2/] เพ็ญจิตร จิตรจันทร์ [2/]
Sompol Nillavesana [1/] Chatnapa khomarwut [2/] Kiangsak Nukpook [3/]
Chamrong Daoruang [4/] Somkid Rattanaburee [2/] Uthai Noppakoonwong [5/] Anan Panyaperm [2/]
Peyanoot Naka [4/] Supattra Lertwattanakiat [4/] Nongkran Chotimudom [2/] Penjit Jitjun [2/]

ABSTRACT

Processing technology for steaming green tea and black tea were operated at the Chiang Mai Royal Agricultural Center (CMRARC), Chiang Mai in 2010-2014. The purposes were to increase value for tea product by research and development of tea processing technology and transfer to the target farmer in order to enhance the quality, value added for export and domestic use. The project consisted of 2 step : the first was to study the tea processing technology for steaming green tea product and black tea product and the second was to test and transfer technology to the farmer. The results found that the best method to make steaming green tea processing from Mae Chon Luang no.3 and Chin Ching no.12 (*Camellia sinensis* var. *sinensis*: Chinese type) was as follows; (1) steamed raw plucking tea leaves (two leaves and a bud) for 60-90 minutes, (2) hot air rolling for 20-30 minutes, and then rolled and pressed for 20 minutes (3) hot air rolling for 40 minutes, (4) finally, dried at 90^{o}C untilled moisture lower than 13% for 3 hours. The best method to make black tea processing from Assam type (*C. sinensis* var. *assamica*) was as follows; (1) withered raw plucking tea leaves (two leaves and a bud) under room temperature untilled 30% (weight) loss, (2) rolled and pressed for 20 minutes and rolled for tearing them, then exposed for fermentation at 45-60 minutes immediately, (3) dried at 110^{o}C untilled tea moisture lower than 13%. Finally, these technologies could be transferred to three farmers communities by directly and apply. The benefit from these technologies could be increase the market price (8-30 times). Moreover, CMRARC published technology, products, leaflets and posters by demonstrations, exhibitions, conferences, trainings, seminars, study tours and answer questions by phone more than 40 times.

Key-words: *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Camellia sinensis* var. *assamica*, steaming green tea, black tea.

---

[1] ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง (Trang Horticultural Research Center)

[2] ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (Chiang Mai Royal Agricultural Research Center)

[3] ศูนย์วิจัยเกษตรวิศวกรรมเชียงใหม่ (Chiang Mai Agricultural Engineering Research Center)

[4] สถาบันวิจัยพืชสวน (Horticultural Research Institute)

[5] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 (Office of Agricultural and Development Region 1)

บทคัดย่อ

การพัฒนางานวิจัยเทคโนโลยีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชาเพื่อผลิตชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ ในปี 2553-2557 มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการแปรรูปชาให้เป็นผลิตภัณฑ์ชาเขียวและชาฝรั่งให้มีคุณภาพได้มาตรฐาน เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ผลิตภัณฑ์ชา โดยศึกษาและพัฒนาวิธีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชาและขยายผลถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมาย มุ่งเน้นให้มีการยกระดับคุณภาพ และมูลค่าของผลิตภัณฑ์ชาไทยให้สามารถแข่งขันกับต่างประเทศ ดำเนินการ 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีแปรรูปชาเป็นผลิตภัณฑ์ โดยศึกษาพัฒนาขั้นตอนการแปรรูปเป็น 2 ผลิตภัณฑ์ได้แก่ ชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบเทคโนโลยีและขยายผล ผลการดำเนินการ พบว่า เทคโนโลยีแปรรูปกลุ่มพันธุ์ชาจีน (พันธุ์แม่จอนหลวงเบอร์ 3 และพันธุ์ชิน ชิง เบอร์ 12) เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชาเขียวชนิดอบไอน้ำที่ดีที่สุดคือ อบไอน้ำ 60-90 วินาที นวดและอบไอร้อนที่ 100^0C นาน 20-30 นาที นวดด้วยเครื่องนวด 20 นาที นวดและอบไอร้อนเพื่อขึ้นรูป 40^0C นาน 40 นาที อบแห้งที่ 90^0C 2-3 ชั่วโมง จนเหลือความชื้น 13% และเทคโนโลยีแปรรูปกลุ่มพันธุ์ชาพื้นเมือง (พันธุ์อัสสัม) เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ชาฝรั่งที่ดีที่สุดคือ ผึ่งยอดชาจนเหลือความชื้น 65-70% นวดด้วยเครื่องนวด 20 นาที ตัดด้วยเครื่องตัดย่อย (ดัดแปลงจากเครื่องโม่เนื้อ) หมักจนเกล็ดชาเปลี่ยนเป็นสีทองแดง (45-60 นาที) อบที่ 110^0C จนเหลือความชื้น 7% การทดสอบและขยายผลเทคโนโลยี พบว่า มีเกษตรกรนำเทคโนโลยีไปใช้โดยตรงและใช้เทคโนโลยีบางส่วน 3 ราย (สามารถจำหน่ายผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่าเดิม 8-30 เท่า) นอกจากนี้ได้เผยแพร่เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ แผ่นพับและโปสเตอร์โดยการสาธิต อบรม นิทรรศการ ประชุมสัมมนาศึกษาดูงาน ตลอดจนตอบคำถามทางโทรศัพท์ มากกว่า 40 ครั้ง

คำหลัก: กลุ่มพันธุ์ชาจีน กลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม ชาเขียวชนิดอบไอน้ำ ชาฝรั่ง (ชาดำ หรือชาแดง)

คำนำ

ชา (*Camellia sinensis,*Tea) เป็นพืชที่ใช้ยอดอ่อนหรือใบ แปรรูปด้วยการทำแห้งเป็นเครื่องดื่มที่นิยมทั่วโลก สารเคมีในชามีมากกว่า 500 ชนิด ทำให้กลิ่นและรสต่างกัน ส่งผลให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน (ศุภชัย, 2550) ขึ้นกับพันธุ์ แหล่งกำเนิด การปลูกดูแลรักษา และกรรมวิธีการผลิต ประเทศไทยอยู่อันดับที่ 26 ของผู้ผลิตชาของโลก (Anonymous, 2012) ผลิตภัณฑ์ชาเขียว พบว่าช่วยขับสารพิษ ป้องกันโรคไขข้ออักเสบรูห์มาติก ป้องกันโรคพาร์กินสัน ลดความเสี่ยงโรคเบาหวาน ชะลอแก่และผิวพรรณเต่งตึง เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ชาดำหรือชาฝรั่ง พบว่าบรรเทาอาการท้องเสีย ช่วยลดเลือนริ้วรอย เป็นต้น ซึ่งทั้งสองผลิตภัณฑ์มีคุณค่าเหมือนกันคือ ลดความเสี่ยงโรคอัลไซเมอร์ ลดความเสี่ยงโรคหัวใจและหลอดเลือด ช่วยลดคลอเรสเตอรอล เร่งเผาผลาญอาหารและไขมัน กำจัดเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ป้องกันฟันผุ ลดความเสี่ยงการเป็นมะเร็ง และผ่อนคลายความเครียด (ธัญธรณ์, 2555)

พันธุ์ชาสำหรับการผลิตชาเขียวและชาจีน ควรมีปริมาณแทนนินในยอดต่ำ (<12-19%) ส่วนพันธุ์ชาสำหรับการผลิตชาฝรั่ง ควรมีปริมาณแทนนินในยอดสูง (>19%) (Takeda, 1994) พันธุ์ชาที่ปลูกในประเทศไทย พบว่า พันธุ์พื้นเมือง (พันธุ์อัสสัม) พันธุ์ชินชิง เบอร์ 12 และพันธุ์แม่จอนหลวง เบอร์ 3 มีปริมาณแทนนิน >19% 12% และ 9.78% ตามลำดับ (Nillavesana et. al, 1998)

ในแต่ละปีประเทศไทยมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์ชาจากต่างประเทศเป็นจำนวนมาก เนื่องจากชาที่ผลิตได้ในประเทศมีคุณภาพไม่ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค เทคโนโลยีแปรรูปชาแตกต่างกันขึ้นกับผู้ประกอบการแต่ละราย และเครื่องจักรที่ใช้ในการแปรรูปมีราคาแพง ดังนั้น จึงดำเนินการศึกษาและทดสอบเทคโนโลยีแปรรูปผลิตภัณฑ์ชา เพื่อถ่ายทอดเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรรายย่อย โดยใช้เครื่องมือที่เกษตรกรมีอยู่เดิม หรือเครื่องจักรที่มีราคาถูกแต่สามารถผลิตชาให้มีรสชาติทัดเทียมกับผลิตภัณฑ์ที่ตลาดต้องการ เพื่อเพิ่มคุณภาพ และมูลค่าของผลิตภัณฑ์ชาไทยให้สามารถแข่งขันกับต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีแปรรูปชาเป็นผลิตภัณฑ์ โดยศึกษาพัฒนาขั้นตอนการแปรรูปเป็น 2 ผลิตภัณฑ์ได้แก่ ชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง

อุปกรณ์และวัสดุสำหรับการทดลอง

1.1 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาเขียวอบไอน้ำ ได้แก่ ยอดชากลุ่มพันธุ์ชาจีน-พันธุ์แม่จอนหลวงเบอร์ 3 และพันธุ์ชินชิง เบอร์ 12 เครื่องอบไอน้ำ เครื่องนวดและอบไอร้อน เครื่องนวดชนิดทรงกระบอกที่มีแรงกดฝาถังหรือทรงฝาชี และเครื่องอบแห้งผลไม้แบบหกเหลี่ยม

1.2 อุปกรณ์และวัสดุสำหรับใช้ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาฝรั่ง ได้แก่ ยอดชากลุ่มพันธุ์ชาพื้นเมือง (พันธุ์อัสสัม) เครื่องนวดชนิดทรงกระบอกที่มีแรงกดฝาถังหรือทรงฝาชี เครื่องตัดย่อย (ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช, เครื่องโม่เนื้อ) และ เครื่องอบแห้งผลไม้แบบหกเหลี่ยม

1.3 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบสีและทดสอบคุณภาพด้วยการชิม

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบเทคโนโลยีและขยายผล โดยถ่ายทอดเทคโนโลยีการแปรรูปชาสู่กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ กลุ่มเกษตรกร ผู้ประกอบการ เจ้าหน้าที่ของรัฐ อาจารย์ และนักเรียนนักศึกษาที่เป็นชาวไทยและชาวต่างประเทศ

อุปกรณ์และวัสดุสำหรับทดสอบเทคโนโลยีและขยายผล

2.1 เอกสารแผ่นพับสำหรับแจกในงานนิทรรศการและฝึกอบรม

2.2 โปสเตอร์แสดงในนิทรรศการและการประชุมสัมมนา

2.3 วัสดุที่ใช้ และแจกเป็นตัวอย่างให้แก่ผู้ดูงานและชมการสาธิต

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีแปรรูปชาเป็นผลิตภัณฑ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาขั้นตอนแปรรูปยอดชากลุ่มพันธุ์ชาจีน (พันธุ์แม่จอนหลวงเบอร์ 3 และพันธุ์ชินชิง เบอร์ 12) เป็นชาเขียวชนิดอบไอน้ำ

ขั้นตอนการแปรรูปชาเขียวอบไอน้ำคือ ช็อคยอดชา-นวดและอบไอร้อน-นวดกระจายความชื้น-นวดและอบไอร้อน-ขึ้นรูป-อบแห้ง ดังนั้นแบ่งการศึกษา 2 การทดลอง ดังนี้

1) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการอบไอน้ำ 4 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ใบชาสดอบไอน้ำที่ 50 วินาที กรรมวิธีที่ 2 ใบชาสดอบไอน้ำที่ 60 วินาที กรรมวิธีที่ 3 ใบชาสดอบไอน้ำที่ 90 วินาที และกรรมวิธีที่ 4 ใบชาสดอบไอน้ำที่ 120 วินาที

2) ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการนวดอบไอร้อน 4 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 นวดและอบไอร้อนนาน 20 นาที กรรมวิธีที่ 2 นวดและอบไอร้อนนาน 30 นาที กรรมวิธีที่ 3 นวดและอบไอร้อนนาน 40 นาที และกรรมวิธีที่ 4 นวดและอบไอร้อนนาน 50 นาที

การทดลองที่ 2 ศึกษาขั้นตอนแปรรูปยอดชากลุ่มพันธุ์ชาพื้นเมือง (พันธุ์อัสสัม) เป็นชาฝรั่ง

ขั้นตอนการแปรรูปชาฝรั่งคือ ผึ่ง-นวด-ตัด-หมัก-อบแห้ง แบ่งการศึกษาเป็น 5 การทดลอง ดังนี้

1) ศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาในการผึ่งชาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในยอดชาสด (ชาใบ) และยอดชาที่ตัดด้วยเครื่องตัดยอดที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช (ชาโม่) 3 กรรมวิธี ดังนี้กรรมวิธีที่ 1 ผึ่งที่ 16^{0}C (ในห้องเย็น) กรรมวิธีที่ 2 ผึ่งที่ 20^{0}C (ในห้องปกติ) และกรรมวิธีที่ 3 ผึ่งที่ 25^{0}C (ในตู้อบทรงหกเหลี่ยม)

2) ศึกษาระดับความชื้นของใบชาที่ผ่านการผึ่ง และการนวดให้เหมาะสมกับเครื่องตัดยอดที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช 8 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ผึ่งจนเหลือความชื้น 68% และไม่นวด กรรมวิธีที่ 2 ผึ่งจนเหลือความชื้น 68% และนวด 8 นาที กรรมวิธีที่ 3 ผึ่งจนเหลือความชื้น 68% และนวด 16 นาที กรรมวิธีที่ 4 ผึ่งจนเหลือความชื้น 72% และไม่นวด กรรมวิธีที่ 5 ผึ่งจนเหลือความชื้น 72% และนวด 8 นาที กรรมวิธีที่ 6 ผึ่งจนเหลือความชื้น 72% และนวด 16 นาที กรรมวิธีที่ 7 ผึ่งจนเหลือความชื้น 76% และไม่นวด กรรมวิธีที่ 8 ผึ่งจนเหลือความชื้น 76% และนวด 8 นาที และกรรมวิธีที่ 9 ผึ่งจนเหลือความชื้น 76% และนวด 16 นาที แล้วนำยอดชาที่ผ่านกรรมวิธีไปตัดด้วยเครื่องตัดย่อยที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช (ขนาดรูตะแกรง 14 มม.) แล้วหมักยอดชานาน 60 นาที แล้วอบแห้งที่ 70^{0}C

3) ศึกษาระดับความชื้นของใบชาที่ผ่านการผึ่ง และการนวดให้เหมาะสมกับเครื่องตัดยอดชาสดที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืชเปรียบเทียบกับเครื่องโม่เนื้อ 8 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ผึ่งจนเหลือความชื้น 80% และนวด 10 นาที กรรมวิธีที่ 2 ผึ่งจนเหลือความชื้น 75% และนวด 10 นาที กรรมวิธีที่ 3 ผึ่งจนเหลือความชื้น 70% และนวด 10 นาที กรรมวิธีที่ 4 ผึ่งจนเหลือความชื้น 65% และ

นวด 10 นาที กรรมวิธีที่ 5 ผึ่งจนเหลือความชื้น 80% และนวด 20 นาที กรรมวิธีที่ 6 ผึ่งจนเหลือความชื้น 75% และนวด 20 นาที กรรมวิธีที่ 7 ผึ่งจนเหลือความชื้น 70% และนวด 20 นาที และกรรมวิธีที่ 8 ผึ่งจนเหลือความชื้น 65% และนวด 20 นาที แล้วนำยอดชาที่ผ่านกรรมวิธีไปตัดด้วยเครื่องตัดย่อยที่เป็นเครื่องย่อยวัชพืช (ขนาดรูตะแกรง 14 มม.) และเครื่องโม่เนื้อที่มีใบตัดจำนวน 4 ใบ (ขนาดของรูตะแกรง 14 มม.) หมักยอดชานาน 60 นาที แล้วอบแห้งที่ 70^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13%

4) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการนวดยอดชาที่ตัดด้วยเครื่องตัดยอดชาสดที่ดัดแปลงจากกับเครื่องโม่เนื้อ 5 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 นวด 5 นาที กรรมวิธีที่ 2 นวด 10 นาที กรรมวิธีที่ 3 นวด 15 นาที กรรมวิธีที่ 4 นวด 20 นาที และกรรมวิธีที่ 5 นวด 30 นาที แล้วนำยอดชาที่ผ่านกรรมวิธีหมักนาน 60 นาที แล้วอบแห้งที่ 70^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13%

5) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักยอดชาสำหรับอบแห้ง 6 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 หมัก 30 นาที กรรมวิธีที่ 2 หมัก 45 นาที กรรมวิธีที่ 3 หมัก 60 นาที กรรมวิธีที่ 4 หมัก 75 นาที กรรมวิธีที่ 5 หมัก 90 นาที และกรรมวิธีที่ 6 หมัก 120 นาที แล้วนำไปอบแห้งที่ 110^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13%

การตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ ทุกการทดลองตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของยอดชา ลักษณะของผลิตภัณฑ์ และคุณภาพการชิม โดยผู้เชี่ยวชาญด้านการชิมชา ร่วมกับผู้ผ่านการฝึกอบรมทางด้านการทดสอบคุณภาพด้วยการชิม ตามหลักตรวจสอบคุณภาพตามมาตราฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาใบ (ชาจีน) เลขที่ มอก.460-2526 และมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาผง (ชาฝรั่ง) เลขที่ มอก. 461-2526 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2526)

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบเทคโนโลยีและขยายผล

1) ทดสอบเทคโนโลยีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่มีการนำเทคโนโลยีแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชาฝรั่งและชาเขียว ไปทดสอบและขยายผลสู่กลุ่มเกษตรกรและผู้ประกอบการ

2) การเผยแพร่เทคโนโลยี ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่เผยแพร่ข้อมูลและให้บริการในรูปแบบต่าง ๆ แก่ กลุ่มเกษตรกร ผู้ประกอบการ เกษตรกรในโครงการตามพระราชดำริ เจ้าหน้าที่ของรัฐ ฝึกงานนักศึกษา สาธิตและอบรมในการออกนิทรรศการ ร่วมจัดนิทรรศการในการประชุมสัมมนา ให้ความอนุเคราะห์ในการศึกษาดูงานในศูนย์ฯ และเผยแพร่ข้อมูลผ่านสื่อ ตลอดจนตอบคำถามทางโทรศัพท์ และได้บันทึกข้อมูลการให้บริการ

ระยะเวลาในการดำเนินงาน : ต.ค. 2553-ก.ย. 2557

สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ กลุ่มเกษตรกรและผู้ประกอบการเกี่ยวกับชาในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และน่าน

ผลการทดลองและวิจารณ์

ขั้นตอนที่ 1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีแปรรูปชาเป็นผลิตภัณฑ์

การทดลองที่ 1 ศึกษาขั้นตอนแปรรูปยอดชากลุ่มพันธุ์ชาจีน (พันธุ์แม่จอนหลวงเบอร์ 3 และพันธุ์ชินชิง เบอร์ 12) เป็นชาเขียวชนิดอบไอน้ำ

1) ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการอบไอน้ำ หลังจากนำยอดชาพันธุ์แม่จอนหลวง เบอร์ 3 และพันธุ์ชิน ชิง เบอร์12 ที่อบด้วยไอน้ำทั้ง 4 กรรมวิธีไปทำการนวดด้วยเครื่องนวดและอบไอร้อนที่อุณหภูมิ 100^{0}C 30 นาที นวดด้วยเครื่องนวดทรงกระบอก 20 นาที อบแห้งที่อุณหภูมิ 90^{0}C 3 ชั่วโมง จนมีความชื้นไม่เกิน 13% นำไปเก็บรักษา เพื่อตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพ พบว่าทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ การอบไอน้ำ 50 วินาที (กรรมวิธีที่ 1) ทำให้น้ำชามีรสฝาดกว่ากรรมวิธีอื่น เนื่องจากอบไอน้ำสั้นเกินไป และการอบไอน้ำ 120 วินาที (กรรมวิธีที่ 4) ทำให้น้ำชามีรสจืด เนื่องจากอบไอน้ำนานเกินไป ดังนั้น การอบไอน้ำ 60 วินาที (กรรมวิธีที่ 2) และอบไอน้ำ 90 วินาที (กรรมวิธีที่ 3) เป็นกรรมวิธีที่เหมาะสมในการแปรรูปเป็นชาเขียวชนิดอบไอน้ำที่มีรสชาติไม่แตกต่างกับผลิตภัณฑ์ของต่างประเทศ (Table 1)

2) ผลการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการนวดอบไอร้อน โดยเลือกอบไอน้ำที่ 60 วินาที เนื่องจากได้น้ำชาที่มีรสชาติดีกว่าที่ 90 วินาที เมื่ออบไอน้ำแล้วนำไปใส่เครื่องนวด และอบไอร้อนที่ 100^{0}C เป็นระยะเวลาต่าง ๆ กันตามกรรมวิธี พบว่า ทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ยอดชาที่นวด และอบไอร้อนนาน 40 และ 50 นาที (กรรมวิธีที่ 3 และ 4) ทำให้ผลิตภัณฑ์ชามีลักษณะค่อนข้างเป็นผง และมีสีใสเมื่อชงเป็นน้ำชา ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการนวดอบไอร้อน คือ 20 และ 30 นาที (กรรมวิธีที่ 1 และ 2) (Table 2)

การศึกษาขั้นตอนแปรรูปยอดชากลุ่มพันธุ์ชาจีนเป็นชาเขียวชนิดอบไอน้ำในครั้งนี้ เป็นการพัฒนาจากงานวิจัยเดิม จากเดิมใช้พันธุ์ชินชินอู่หลง (สมพล และคณะ, 2542) เปลี่ยนใช้พันธุ์แม่จอนหลวงเบอร์ 3 และพันธุ์ชินชิงเบอร์ 12 เนื่องจากพบว่าพันธุ์ดังกล่าวเหมาะสำหรับแปรรูปเป็นชาเขียว (Nillavesana et. al, 1998) มีการประยุกต์ใช้เครื่องมือทั้งจากเดิมที่เกษตรกรใช้ และต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพง ซึ่งปรับปรุงโดยสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรม ได้แก่ เครื่องอบไอน้ำ (แทนลังถึง) เครื่องนวดและอบไอร้อน และเครื่องอบแห้งผลไม้แบบหกเหลี่ยม (สมพล และคณะ, 2547; เกรียงศักดิ์ และชวนชื่น, 2554ก; เกรียงศักดิ์ และชวนชื่น, 2554ข) สำหรับขั้นตอนแปรรูปโดยเฉพาะระยะเวลาที่ใช้ พบว่าแตกต่างกับประเทศอื่นๆ ได้แก่ ญี่ปุ่น ศรีลังกา และอินเดีย เป็นต้น (Fig. 1) (สมพล และ Shimonkado, 1990; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551; Singh, et al., 2014) แต่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีทัดเทียมต่างประเทศ

การทดลองที่ 2 ศึกษาขั้นตอนแปรรูปยอดชากลุ่มพันธุ์ชาพื้นเมือง (พันธุ์อัสสัม) เป็นชาฝรั่ง

1) ศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและเวลาในการผึ่งชาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในยอดชาสด (ชาใบ) และยอดชาที่ตัดด้วยเครื่องตัดยอดที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช (ชาโม่) เพราะการผึ่งชาเป็น

ขั้นตอนแรกเพื่อลดความชื้นในใบชาให้มีระดับความชื้นที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการตัดยอดชา และกระตุ้นให้เกิดการหมักอย่างอ่อนของสารเคมีภายในยอดชา พบว่า เปอร์เซ็นต์ความชื้นโดยน้ำหนักจะลดลงแปรผันตามระยะเวลาในการผึ่งที่อุณหภูมิและเวลาผึ่งเดียวกัน และพบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นของชาตัดย่อยมีค่าน้อยกว่าชาใบ หากต้องการลดความชื้นในยอดเป็น 70-73% (ความชื้นที่แนะนำโดยทั่วไป) หากผึ่งที่ 16^{0}ซ. ใช้เวลาผึ่งมากกว่า 15 ชั่วโมง ที่ 20^{0}C ใช้เวลาผึ่ง 15-18 ชั่วโมง และที่ 25^{0}C ใช้เวลาผึ่งไม่เกิน 3 ชั่วโมง ซึ่งการผึ่งที่ 25^{0}C ใช้เวลาผึ่งน้อยที่สุด (Figure 2, 3 และ 4) แต่ทำให้ชาฝรั่งที่ไม่มีคุณภาพ สอดคล้องกับ สายใจ (2550) ที่ทดลองผึ่งและนวดชาในสภาพควบคุมที่มีอุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันเพื่อทำให้มีปริมาณ Theaflavin และ Thearubigin ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นหอม และสีแดงในน้ำชา ค่าสี กลิ่น และรสชาติจากการทดสอบประสาทสัมผัสมากที่สุด ชาโม่พบว่า สภาพที่เหมาะสมคือ การผึ่งที่ 20^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นวด 16 นาที และชาใบพบว่าสภาพที่เหมาะสมคือ การผึ่งที่ 16^{0}C เป็นเวลา 10.22 ชั่วโมง นวด 2 นาที การผึ่งที่ 25^{0}C พบว่าไม่เหมาะสมเพราะความชื้นลดลงในขณะที่ยอดชายังไม่เกิดปฏิกิริยาเคมีที่ทำให้เกิดคุณสมบัติชาฝรั่ง (สีของชาไม่เปลี่ยน, กลิ่นของชาไม่หอม) แต่ปัญหาที่พบต่อมาคือ ช่วงเวลาการแปรรูปในประเทศไทยเป็นช่วงฤดูฝน มีอุณหภูมิ 20-25^{0}C และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 80-95% ทำให้การสูญเสียน้ำจากยอดชาที่ผึ่งใช้เวลาเป็นเกณฑ์กำหนดทำได้ยาก เนื่องจากสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ แต่ถ้าต้องการควบคุมระดับอุณหภูมิของอากาศในขณะทำการผึ่ง จะทำให้มีค่าใช้จ่ายในการปรับอุณหภูมิเป็นภาระที่หนักเกินไปสำหรับเกษตรกรผู้ปลูกชาหรือผู้แปรรูปชารายย่อย ดังนั้นการผึ่งจึงควรใช้น้ำหนักของยอดชาเป็นเกณฑ์แทนการใช้ช่วงเวลา

2) ศึกษาระดับความชื้นของใบชาที่ผ่านการผึ่ง และการนวดให้เหมาะสมกับเครื่องตัดยอดที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช พบว่า ผึ่งจนใบชามีความชื้น 68-72% นวดเป็นเวลา 8-16 นาที (กรรมวิธีที่ 2 3 5 และ 6) แล้วตัดด้วยเครื่องตัดย่อยที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืช (ขนาดรูตะแกรง 14 มม.) แล้วหมักนาน 60 นาที แล้วอบแห้งที่ 70^{0}C ทำให้ได้น้ำชาที่มีลักษณะตามต้องการคือ มีกลิ่นชาฝรั่ง (อ่อน) มีรสฝาดเล็กน้อย และมีสีน้ำตาลแดง แต่ปัญหาที่พบคือ ผงชามีลักษณะขนาดใหญ่กว่าที่ต้องการ และชาสูญเสียมากในขณะที่บดย่อย จึงควรศึกษาหาเครื่องมือที่ใช้ทดแทนเครื่องย่อยวัชพืช (Table 3)

3) ศึกษาระดับความชื้นของใบชาที่ผ่านการผึ่ง และการนวดให้เหมาะสมกับเครื่องตัดยอดชาสดที่ดัดแปลงจากเครื่องย่อยวัชพืชเปรียบเทียบกับเครื่องโม่เนื้อ พบว่า ผึ่งจนใบชามีความชื้น 65-70% นวดเป็นเวลา 20 นาที (กรรมวิธีที่ 7 และ 8) แล้วตัดยอดชาด้วยเครื่องตัดที่ดัดแปลงจากเครื่องโม่เนื้อแล้วหมักนาน 60 นาที และอบแห้งที่ 70^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13% ทำให้ชาสูญเสียขณะตัดย่อยน้อยที่สุดคือ 3% ได้กากชาที่มีขนาดเล็ก มีสีเขียวปนแดง น้ำชามีกลิ่นและสีของชาฝรั่งชัดเจนกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ไม่มีกลิ่นเหม็นเขียว แต่ปัญหาที่พบคือมีรสชาติจืด มีสาเหตุจากการหมักของยอดชาที่ตัดแล้วเกิดขึ้นไม่เต็มที่จึงต้องศึกษาช่วงเวลาของการนวดขึ้นหลังการตัดเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการหมักยอดชา (Table 4)

4) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการนวดยอดชาที่ตัดด้วยเครื่องตัดยอดชาสดที่ดัดแปลงจากกับเครื่องโม่เนื้อ พบว่า ผึ่งจนใบชามีความชื้น 70% นวดเป็นเวลา 20 นาที (กรรมวิธีที่ 4) แล้วตัดยอดชาด้วยเครื่องตัดยอดชาสดที่ดัดแปลงจากเครื่องโม่เนื้อ แล้วหมักนาน 60 นาที และอบแห้งที่ 70^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13% ทำให้ได้สีภายนอกของผลิตภัณฑ์ที่มีสีสม่ำเสมอ กากชาเมื่อชงไม่เป็นสีเขียว น้ำชามีกลิ่นหอมเฉพาะอ่อน ๆ ของชาฝรั่ง มีสีน้ำตาลแดงเข้ม มีรสฝาดเล็กน้อย รูปทรงภายนอกของผลิตภัณฑ์มีขนาดเกล็ดเล็กกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ แต่ปัญหาที่พบคือ น้ำชา มีกลิ่นของชาฝรั่งอ่อน รสชาติของน้ำชาจืด มีสาเหตุจากระยะเวลาในการหมักยอดชาเกิดขึ้นไม่เต็มที่ และอุณหภูมิที่ใช้ในการอบแห้งคือที่ 70^{0}C เป็นอุณหภูมิที่ไม่สามารถให้ยอดชาหยุดกระบวนการทางเคมีได้ ส่งผลให้สีของ น้ำชา กากชา และสีภายนอกของผลิตภัณฑ์ค่อนข้างดำ (Table 5)

5) ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับหมักยอดชาสำหรับอบแห้งที่ 110^{0}C พบว่า ผึ่งจนใบชามีความชื้น 70% นวดเป็นเวลา 20 นาที แล้วตัดยอดชาด้วยเครื่องตัดยอดชาสดที่ดัดแปลงจากเครื่องโม่เนื้อ แล้วหมักนาน 45-60 นาที (กรรมวิธีที่ 2 และ 3) และอบแห้งที่ 110^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13% ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ชาฝรั่งที่มีคุณภาพไม่แตกต่างจากต่างประเทศ (Table 6)

การศึกษาขั้นตอนแปรรูปยอดชากลุ่มพันธุ์ชาพื้นเมือง (พันธุ์อัสสัม) เป็นชาฝรั่งในครั้งนี้ มีการประยุกต์ใช้เครื่องมือที่ปกติมีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ปรับปรุงโดยสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรม ได้แก่ เครื่องอบแห้งผลไม้แบบหกเหลี่ยม (เกรียงศักดิ์ และชวนชื่น, 2554ข) และมีการดัดแปลงเครื่องตัดยอดชาสดจากเครื่องโม่เนื้อโดยคณะนักวิจัย สำหรับขั้นตอนแปรรูปโดยเฉพาะระยะเวลาที่ใช้ พบว่าแตกต่างกับวิธีการดั้งเดิมของประเทศไทยและประเทศอื่นๆ ได้แก่ ยุโรป อินเดีย และศรีลังกา เป็นต้น (Fig. 5) (เถาวัลย์, 2545; พยุงศักดิ์, 2554; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551) แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพดีทัดเทียมต่างประเทศ

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบเทคโนโลยีและขยายผล

1) การทดสอบเทคโนโลยีการแปรรูป ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ มีการนำเทคโนโนโลยีไปทดสอบและขยายผลใน 2 รูปแบบ คือ 1) เกษตรกรได้นำไปใช้โดยตรง ในส่วนเทคโนโลยีแปรรูปเป็นชาฝรั่ง ซึ่งมีเกษตรกร 2 ราย ที่ใช้เทคโนโลยีใน 2 รูปแบบ คือ (1) ร้านค้าชาวเขา (ในพระบรมราชานุเคราะห์) กลุ่มวิสาหกิจชุมชนชาดอยปู่หมื่น นายพยุงศักดิ์ ไชยกอ บ้านเลขที่: 307 หมู่ 4 ต.ในเวียง อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ 50116 ที่นำเทคโนโลยีไปใช้โดยตรง โดยประยุกต์ใช้กับเครื่องมือที่มีอยู่เดิม ทำให้สามารถจำหน่ายผลิตภัณฑ์ได้ราคาเพิ่มขึ้นจากเดิม 30 เท่า (เดิมราคา 80-90 บ./กก. เป็น 2,300 บ./กก.) (2) ร้าน ACABA นายนพดล ทินรัตน์วรกุล บ้านป๊อก หมู่ 1 ต.ห้วยแก้ว อ.แม่ออน จ.เชียงใหม่ ที่ได้นำชามาแปรรูปที่ศูนย์ฯ และนำไปจำหน่ายได้ราคาเพิ่มขึ้นจากเดิม 8-11 เท่า (เดิมราคา 70-80 บ./กก. เป็น 600-800 บ./กก.) สำหรับเทคโนโลยีแปรรูปเป็นชาเขียวชนิดอบไอน้ำ พบว่าเกษตรกรนำไปใช้เฉพาะระยะเวลาที่ใช้ในขั้นตอนการอบไอน้ำ (โครงการตามพระราชดำริฯ ดอยม่อนล้าน อ.พร้าว จ.เชียงใหม่)

2) การเผยแพร่เทคโนโลยี ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ มีการเผยแพร่เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ รวมถึงแผ่นพับและโปสเตอร์ตั้งแต่ปี 2553-2557 ดังนี้ สาธิต (2 ครั้ง) อบรม (6 ครั้ง) นิทรรศการ (10 ครั้ง) ประชุมสัมมนา (3 ครั้ง) ศึกษาดูงานในศูนย์ฯ (20 ครั้ง) และเผยแพร่ข้อมูลผ่านสื่อ ตลอดจนตอบคำถามทางโทรศัพท์ และได้บันทึกข้อมูลการให้บริการ

สรุปผลการทดลอง

เทคโนโลยีแปรรูปชาเป็นผลิตภัณฑ์ มีการพัฒนาเป็น 2 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง ดังนี้

1) ชาเขียวชนิดอบไอน้ำ โดยใช้ยอดชากลุ่มพันธุ์ชาจีน สายพันธุ์แม่จอนหลวงเบอร์ 3 และสายพันธุ์ชินชิงเบอร์ 12 อบไอน้ำด้วยเครื่องอบไอน้ำตามแบบสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรมนาน 60-90 วินาที นวดอบไอร้อนด้วยเครื่องนวดและอบไอร้อนตามแบบสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรมที่ 100^{0}C นาน 20-30 นาที นวดด้วยเครื่องนวดชนิดทรงกระบอกที่มีแรงกดฝาถังหรือทรงฝาชีนาน 20 นาที อบไอร้อนด้วยเครื่องนวดและอบไอร้อนเพื่อขึ้นรูปที่ 40^{0}C นาน 40 นาที อบด้วยเครื่องอบแห้งผลไม้แบบหกเหลี่ยมตามแบบสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรมที่ 90^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13% นาน 3 ชั่วโมง

2) ชาฝรั่ง โดยใช้ยอดชากลุ่มพันธุ์ชาอัสสัม (ชาพื้นเมือง) ผึ่งยอดชาสดจนเหลือความชื้น 65-70% นวดด้วยเครื่องนวดชนิดทรงกระบอกที่มีแรงกดฝาถังหรือทรงฝาชีนาน 20 นาที และตัดด้วยเครื่องตัดย่อย (ดัดแปลงจากเครื่องโม่เนื้อที่มีกำลังการบด 40-50 กก./ชม. ขับเคลื่อนวัตถุดิบด้วยเกลียวลำเลียง ใช้ระบบสายพานกำหนดขนาดของยอดชาที่ถูกตัดด้วยขนาดรูบนหน้าแว่น 14 มม.) หมักจนเกล็ดชาสดเปลี่ยนเป็นสีทองแดงหรือประมาณ 45-60 นาที อบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งผลไม้แบบหกเหลี่ยมตามแบบสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรมที่ 110^{0}C จนเหลือความชื้นไม่เกิน 13 %

การทดสอบและขยายผลเทคโนโลยี โดยมีเกษตรกรนำเทคโนโลยีไปใช้โดยตรงและใช้เทคโนโลยีบางส่วน 3 ราย ทำให้เกษตรกรสามารถจำหน่ายผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่าเดิม 8-30 เท่า นอกจากนี้ได้มีการเผยแพร่เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ รวมถึงแผ่นพับและโปสเตอร์โดยการสาธิต อบรม นิทรรศการ ประชุมสัมมนา ศึกษาดูงาน ตลอดจนตอบคำถามทางโทรศัพท์ มากกว่า 40 ครั้ง

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ด้านการสร้างอาชีพ การถ่ายทอดเทคโนโลยีการแปรรูปชาเน้นถ่ายทอดให้กลุ่มเกษตรกรที่มีการรวมกลุ่มในรูปวิสาหกิจ เพื่อให้เกิดการสร้างงานเป็นระบบตั้งแต่ ผู้ปลูก ผู้แปรรูป และตลาด รวมถึงผู้ที่นำผลิตภัณฑ์ไปใช้ประโยชน์ในรูปของการจำหน่ายเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่ม อาหารและขนมต่างๆ ทำให้เกิดการสร้างงานและเงินหมุนเวียนในระบบ

2. ด้านการรักษาฐานการผลิตชาฝรั่งของประเทศไทย และการอนุรักษ์พันธุกรรมชาอัสสัม (ชาพื้นเมือง) เนื่องจากชาอัสสัมเดิมปลูกไว้เพื่อแปรรูปเป็นเมี่ยง ได้แปรรูปเป็นชาฝรั่งด้วยวิธีการใหม่ หันมาสนใจดูแลสวนชาที่เป็นพืชพื้นเมืองเดิมมากขึ้น ส่งผลให้ได้อนุรักษ์ดินและน้ำโดยเฉพาะพื้นที่สูงในภาคเหนือได้เป็นอย่างดี

3. ด้านการขยายผลการศึกษาวิจัย ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ เป็นแหล่งวิชาการที่มีข้อมูลพื้นฐานในด้านการปรับปรุงพันธุ์ การเขตกรรม และการแปรรูปในเรื่องชาโดยเฉพาะ ซึ่งนักเรียน นักศึกษา ครู อาจารย์ มาขอข้อมูลไปทำโครงงาน ปัญหาพิเศษ วิทยานิพนธ์ รวมถึงชาวต่างประเทศที่เป็นเกษตรกร นักวิชาการ และนักเขียน

คำขอบคุณ

นายนรินทร์ พูนเพิ่ม ดร.นันทรัตน์ ศุภกำเนิด ตลอดจนข้าราชการ ลูกจ้างประจำ และพนักงานราชการของศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. การปลูกและผลิตชาอย่างครบวงจร. เอกสารตามโครงการความร่วมมือไทย-ศรีลังกา. 48 หน้า.

กระทรวงอุตสาหกรรม. 2526. มาตราฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาใบ (ชาจีน) มอก.460-2526. ในประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 693 ลงวันที่ 27 เมษายน 2526.

กระทรวงอุตสาหกรรม. 2526. มาตราฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมชาผง (ชาฝรั่ง) มอก. 461-2526. ในประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 639 ลงวันที่ 27 เมษายน 2526.

เกรียงศักดิ์ นักผูก และชวนชื่น เดี่ยววิไล. 2554ก. การวิจัยและพัฒนาเครื่องอบไอน้ำชาเขียว. ว. วิทย. กษ. 42(1)(พิเศษ):533-536.

เกรียงศักดิ์ นักผูก และชวนชื่น เดี่ยววิไล. 2554ข. การพัฒนาและประเมินผลตู้อบแห้งชาเขียวลมร้อน. ว. วิทย. กษ. 42(3)(พิเศษ):466-469.

ธัญธรณ์ ศิริพงษ์ไพศาล. 2555. มหัศจรรย์แห่งความงามและสุขภาพ ชาขาว ชาเขียว และชาดำ. บริษัทไพลินบุ๊คเน็ต จำกัด (มหาชน). 112 หน้า.

พยุงศักดิ์ ไชยกอ. 2554. การแปรรูปชาฝรั่ง. ร้านค้าชาวเขา (ในพระบรมราชานุเคราะห์) กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกชาดอยปู่หมื่น อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่.

เถาวัลย์ คำแดง. 2545. การแปรรูปชาผง. กลุ่มเกษตรกรผู้ปลูกชาป่าแป๋ อ.แม่แตง จ.เชียงใหม่.

ศุภชัย ติยวรนันท์. 2550. ชา ชา. สสวท. 148:พฤษภาคม-มิถุนายน.

สายใจ ชัยศิขริน. 2550. การพัฒนาคุณภาพการผลิตชาฝรั่งโดยแนวทางการออกแบบการทดลอง. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมพล นิลเวศน์ และ Shimonkado Hisashi. 2533. รายงานผลการฝึกอบรมหลักสูตร Tea Cultivation, Quality and Chemical Analysis on Tea ณ Tea Research Institute, Kumamoto, Japan.

สมพล นิลเวศน์ ไมตรี แนวพานิช วิบูรณ์ เทเพนท์และยงยุทธ คงซ่าน. 2547. การวิจัยและพัฒนาเครื่องอบไอน้ำชาเขียว. ในรายงานผลการวิจัยเรื่องเต็มกลุ่มวิจัยวิศวกรรมหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันเกษตรวิศกรรม กรมวิชาการเกษตร, วันที่ 15-17 มีนาคม 2547, โรงแรมการ์เด้น ซีวิว รีสอร์ท จ.เชียงใหม่.

สมพล นิลเวศน์ ถนอม ไชยปัญญา และอุทัย นพคุณวงศ์. 2542. การศึกษาวิธีผลิตชาเขียว. ในรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2541-2542 ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. หน้า 136-151.

Anonymous. 2012. Country rank in the world, by commodity. FAOSTAT http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx (access on 4/27/2015)

Nillavasana, S., Sh. Hisashi, and U. Noppakunwong. 1998. Observation on Tannin, total nitrogen and amino acid content between tea cultivars in northern part of Thailand to selected for green tea.

Singh1, V., D. K. Verma, and G. Singh. 2014. Processing Technology and Health Benefits of Green Tea. Pop. Kheti. 2(1):23-30.

Takeda, Y. 1994. Differences in Caffeine and Tannin Contents between Tea Cultivars and Application to Tea Breeding. JARQ. 28(2):117-123.

Table 1 Quality of Steaming green tea tasting from experimental of suitable period for steaming

Treatment	Character of tea leaf		Character of tea leaf after brewing		Character of liquor tea			Total	Total score
	Shape(10)	Color(10)	Shape(10)	Color(10)	Taste(20)	Color(20)	Aroma(20)		
Treatment 1	7.00 a	7.33 ab	7.33 a	6.67 a	15.00 a	15.33 a	15.33 a	45.66	73.99
Treatment 2	6.50 a	6.67 b	7.33 a	7.33 a	15.50 a	17.17 a	16.67 a	49.34	77.51
Treatment 3	6.83 b	7.50 ab	7.33 a	7.33 a	16.67 a	17.17 a	17.50 a	51.37	80.70
Treatment 4	6.67 b	6.67 b	7.33 a	7.33 a	15.33 a	16.67 a	16.00 a	48.00	76.00
Shizuoka	8.33 b	8.67 ab	8.00 a	8.33 a	17.33 a	18.67 a	18.00 a	54	87.33
Kyoto	9.33 b	9.00 a	8.33 a	8.67 a	17.00 a	18.00 a	18.00 a	53	88.33
F-test .05	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
%CV	9.63	13.97	32.31	16.60	16.22	12.88	17.35		

Table 2 Appearance of steaming green tea product from experimental of suitable period for drying by tea roller

Treatment	Color of leaves			Color of liquor tea		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
Treatment 1	35.59 a	-2.48 a	11.49bc	39.36 a	-3.34 c	17.01 ab
Treatment 2	34.61ab	-2.40 a	11.05 bc	39.63 a	-3.36 c	17.15 a
Treatment 3	32.46 cd	-2.41 a	10.57 bc	39.37 a	-3.07 a	16.58 bc
Treatment 4	30.96 d	-2.50 a	12.00 ab	39.15 a	-3.37 c	16.41 c
Shizuoka	33.32 bc	-3.58 b	13.38 a	32.02 c	-3.17 ab	12.36 d
Kyoto	30.52 d	-3.99 c	10.33 c	38.38 b	-3.30 bc	11.80 e
F-test .05	**	**	**	*	*	**
%CV	5.25	11.41	11.91	1.52	4.01	3.13

Remark L^* = Light $-a^*$ = Green $+a^*$ = Red $-b^*$ = Blue $+b^*$ = Yellow

Table 3 The relationship between moisture and period of exposure for breaking and tea leaves by Chipper machines

Treatment	Cutting machine	Weigh before cutting (kg.)	Weigh after cutting (kg.)	Withered time (hours.)	Character of liquor tea
Treatment 1	Chipper machines	17	11.4	21	Faint grassy aroma, light astringent, yellow-red
Treatment 2	Chipper machines	17	11.7	19	Light Black tea aroma, light astringent, brown-red
Treatment 3	Chipper machines	17	11.7	22	Light Black tea aroma, light astringent, brown-red
Treatment 4	Chipper machines	18	10.5	14	Faint grassy aroma, light astringent, yellow-red
Treatment 5	Chipper machines	18	10.3	13	Light Black tea aroma, light astringent, brown-red
Treatment 6	Chipper machines	18	10.5	13	Light Black tea aroma, light astringent, brown-red
Treatment 7	Chipper machines	19	10.6	9	Faint grassy aroma, light astringent, yellow-red
Treatment 8	Chipper machines	19	10.5	9	Light Black tea aroma, light astringent, yellow-red
Treatment 9	Chipper machines	19	10.7	10	Light Black tea aroma, light astringent, yellow-red

Table 4 The relationship between moisture and period of exposure for breaking tea leaves by Chipper machines compare with modified meat grinder

Treatment	Cutting machine	Weigh before cutting (kg.)	Weigh after cutting (kg.)	Loss (%)	Withered time (mins.)	Character of of leaf after brewing	Evaluation
Treatment 1	Chipper machines	17	11.4	38	29	Large, stalk, green	Not pass
Treatment 2	Chipper machines	17	11.7	36	25	Large, stalk, green	Not pass
Treatment 3	Chipper machines	17	11.7	35	27	Large, stalk, green	Not pass
Treatment 4	Chipper machines	18	10.5	35	27	Large, stalk, green-red	Not pass
Treatment 5	Chipper machines	18	10.3	34	28	Large, stalk, green-red	Not pass
Treatment 6	Chipper machines	18	10.5	34	24	Large, stalk, green-red	Not pass
Treatment 7	Chipper machines	19	10.6	31	25	Large, stalk, green-red	Not pass
Treatment 8	Chipper machines	19	10.5	32.5	25	Large, stalk, green-red	Not pass
Treatment 1	Modified meat grinder	9.6	8.6	10	14	Small, green	Not pass
Treatment 2	Modified meat grinder	9.0	8.5	6	9	Small, green	Not pass
Treatment 3	Modified meat grinder	8.4	7.9	5	9	Small, green-red	Pass
Treatment 4	Modified meat grinder	8.0	7.6	5	11	Small, green-red	Pass
Treatment 5	Modified meat grinder	9.6	8.8	8	10	Small, green-red	Pass
Treatment 6	Modified meat grinder	9.0	8.6	4	7	Small, green-red	Pass
Treatment 7	Modified meat grinder	8.4	8.1	3	8	Small leaf, green-red	Pass
Treatment 8	Modified meat grinder	8.0	7.8	3	9	Small, green-red	Pass

Table 5 Quality of black tea product from the study of suitable time for rolling of tea leaves break

Treatment	Character of Product	Character of leaf after brewing	Color of liquor of tea	Aroma of liquor	Taste
Treatment 1	large	large	bright brown-red	Light aroma	astringent
	brown-green	green-copper	with green ring	(black tea aroma)	
Treatment 2	large	large	bright brown-red	Light aroma	astringent
	brown-green	green-copper	with green ring	(black tea aroma)	
Treatment 3	large	large	bright brown-red	Light aroma	Light astringent
	regular dark brown	green-copper	with green ring	(black tea aroma)	
Treatment 4	Large dust	large	bright brown-red	Light aroma	Light astringent
	Regular dark brown	copper	with green ring	(black tea aroma)	
Treatment 5	Large dust	large	Bright brown-red	Light aroma	Light astringent
	Regular dark brown	copper	with green ring	(black tea aroma)	
Sample (check)	Small dust	Dark red-brown	Brown-red	aroma	astringent
	Regular brown-black	Regular color	Not bright and clear	(black tea aroma)	

Table 6 Quality of black tea product from the study of suitable time for fermentation of tea leaves

treatment	Color of leaves		Leaf after brewing		Liquor			Total	Liquor of tea		
	Shape(10)	Color(10)	Shape(10)	Color(10)	Color (20)	Aroma(20)	Taste(20)	score	a*	b*	L*
Treatment 1	7.50	7.50	7.33	7.50	15.33	17.33	17.00	79.49	6.89	8.32	25.09
Treatment 2	7.50	7.50	7.33	8.17	15.67	17.00	17.67	80.84	7.02	8.49	25.31
Treatment 3	7.50	7.50	7.33	7.50	15.50	17.00	17.67	80.00	6.95	8.86	25.67
Treatment 4	7.50	7.50	7.33	8.00	14.67	16.00	17.67	77.67	6.97	9.26	26.06
Treatment 5	7.50	7.83	7.33	7.50	14.67	16.00	16.67	77.50	7.41	8.36	25.13
Treatment 6	7.50	7.50	7.33	8.00	14.67	16.00	16.67	77.67	6.83	9.06	25.88
Sample(check)	9.33	9.17	9.33	8.00	15.33	17.67	16.67	85.50	7.26	5.63	22.61
LSD 0.05	0.90**	0.92*	1.01**	ns	0.99	ns	ns		ns	0.95**	0.92**
CV(%)	6.59	6.72	7.58	6.55	3.71	8.05	3.81		6.49	7.84	2.49

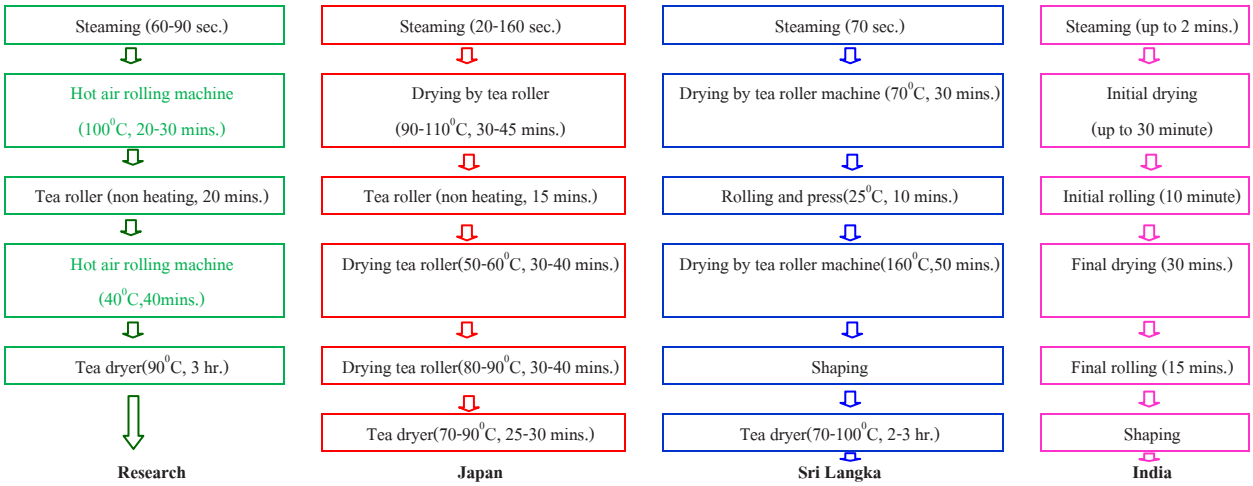


Figure 1 Processing of Steaming Green Tea.

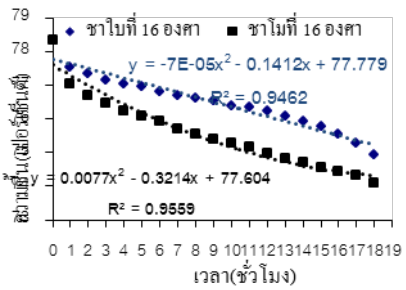


Figure 2 The relationship between moisture and period of exposure for breaking and tea leaves at 16°C

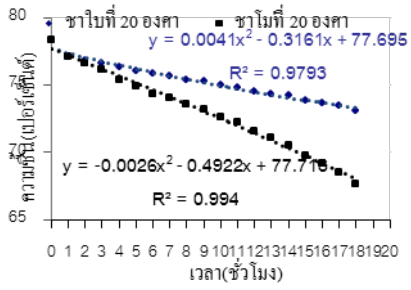


Figure 3 The relationship between moisture and period of exposure for breaking and tea leaves at 20°C

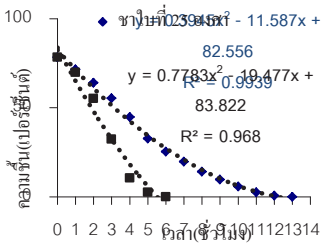


Figure 4 The relationship between moisture and period of exposure for breaking and tea leaves at 25°C

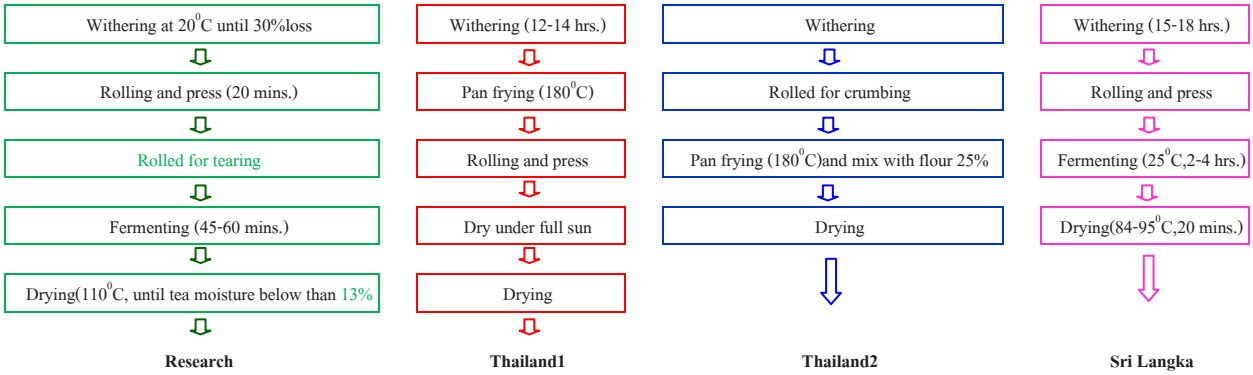


Figure 5 Processing of Black Tea.



The raw plucking Chinese tea leaves (two leaves and a bud)



Steaming by Steaming machine (60-90 seconds)



Hot air Rolling machine (100^{0}C, 20-30 mins.)



Rolling and press by Roller machine (20 minutes)



Hot air Rolling machine (40^{0}C, 40 mins.)



Drying at 90^{o}C by Dryer machine untill tea moisture lower than 13%



Steaming green tea product

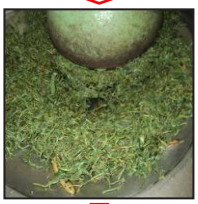
Suitable process for steaming green tea product



The raw plucking Assum tea leaves (two leaves and a bud)



Withering under room temperature untill 30% (weight) loss



Rolling and press by Roller machine (20 minutes)



Rolled for crumbing by Cutting machine (modified meat grinder)



Expose for fermentation (45-60 minutes)



Dried at 110^{o}C by Dryer machine untill tea moisture lower than 13%



Black tea product

Suitable process for black tea product





Black tea products of farmer

วิจัยและพัฒนาไถระเบิดดินดานสำหรับไร่มันสำปะหลังติดรถแทรกเตอร์ขนาดกลาง

Research and Development of Subsoiler for Cassava Attached with Medium-Size Tractor

ยุทธนา เครือหาญชาญพงค์ [1/] อานนท์ สายคำฟู [1/] พงษ์ศักดิ์ ต่ายก้อนทอง [1/]
พินิจ จิรัคคกุล [1/] อุษฎา สุขจันทร์ [2/] อนุสรณ์ เทียนศิริฤกษ์ [2/] อัคคพล เสนาณรงค์ [1/]
Yuttana Khaehanchanpong [1/] Anon Saikamfu [1/] Pongsak Trykorntong [1/]
Pinit Jirakakul [1/] Utchida Sukjun [2/] Anusorn Teansiriroak [2/] Akkapol Senanarong [1/]

ABSTRACT

Soil compaction occur under the downward forces of heavy machine in the field. The soil can be defined as an increase in its dry density, and the closer packing of solid particles or reduction in porosity. Subsoiler which large size tractor used to loosen and break up soil but almost high price for using in the field. At present, tractors 49-50 hp are widely used in the fields but still has not proper size of subsoiler to attach with. This research was design subsoiler to connect with this size tractor. The subsoiler designed was 2 shank, 2 wing and the shank length of 1 m. At the end of the shank was designed to provide the angle with 30 degrees on a width 3.81 cm. For the field test in Khonkaen province, the soil compaction depth 35 cm., 14.53% moisture content. Subsoiler can disrupt soil compaction grown down to 41 cm depths, the capacity was 2.41 rai/hr, field efficiency 70.71%, fuel consumption 3.52 liter/rai. A subsoiler for 49-50 hp tractor was designed to be utilized conveniently. As a result, it can help solve the problem in the field by themselves.

Key-words: Subsoiler, Tractor, 49-50 hp

[1] สถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร
Agricultural Engineering Research Institute, Department of Agriculture
[2] กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร
Agricultural Production Science Research and Development Division, Department of Agriculture

บทคัดย่อ

จากการใช้เครื่องจักรกลการเกษตรขนาดใหญ่ในพื้นที่ปลูกพืชไร่ของเกษตรกร ทำให้ชั้นดินมีลักษณะแน่นทึบและแข็งมาก เนื้อดินมีช่องว่างสำหรับน้ำและอากาศน้อย เกิดชั้นดินดานขึ้น ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวมีการใช้งานไถระเบิดดินดาน ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ไถระเบิดดินดานพ่วงติดกับรถแทรกเตอร์ขนาดใหญ่ ซึ่งมีราคาแพง รวมถึงค่าจ้างในการระเบิดดินดานแต่ละครั้ง ราคาค่อนข้างสูง ในปัจจุบันมีการใช้งานรถแทรกเตอร์ขนาด 49-50 แรงม้า กันอย่างแพร่หลายในงานไร่ แต่ยังขาดเครื่องมือไถระเบิดดินดาน ผู้วิจัยจึงได้ทำการออกแบบไถระเบิดดินดาน เพื่อใช้ต่อพ่วงกับรถแทรกเตอร์ขนาดดังกล่าว ไถระเบิดดินดานที่ออกแบบเป็นแบบ 2 ขา มีปีกสองข้าง ขนาดขาไถยาว 1 เมตร ที่ปลายขาไถถูกออกแบบให้มีมุมจิกสำหรับระเบิดดินดานที่ 30 องศา มีความกว้างของหัวจิกที่ 3.81 เซนติเมตร การทดสอบทำการทดสอบไถระเบิดดินดานในแปลงของเกษตรกรปลูกอ้อย ที่ อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น มีดานลึกที่ 35 เซนติเมตร ที่ความชื้นดิน 14.53 % พบว่า สามารถระเบิดดินดานได้ โดยไถระเบิดดินดานสามารถไถได้ที่ความลึกเฉลี่ย 41 เซนติเมตร มีความสามารถในการทำงานเฉลี่ย 2.41 ไร่/ชม มีประสิทธิภาพการทำงานเชิงพื้นที่เฉลี่ย 70.71% ใช้น้ำมันเชื้อเพลิงเฉลี่ย 3.52 ลิตร/ไร่ ไถระเบิดดินดานที่ออกแบบมาใหม่นี้สามารถใช้กับรถแทรกเตอร์ขนาด 49 แรงม้า ซึ่งที่ผ่านมายังไม่มีการใช้งานไถระเบิดดินดานกับรถแทรกเตอร์ที่มีต้นกำลังขนาดนี้ จึงนับว่าจะเป็นอีกหนึ่งทางเลือกให้เกษตรกรที่มีรถแทรกเตอร์ขนาดดังกล่าวสามารถไถระเบิดดินดานได้ด้วยตัวเอง ไม่จำเป็นต้องจ้างรถแทรกเตอร์ขนาดใหญ่ มาทำการไถระเบิดดินดาน

คำหลัก : ไถระเบิดดินดาน, รถแทรกเตอร์, 49-50 แรงม้า

คำนำ

จากการใช้เครื่องจักรกลการเกษตรขนาดใหญ่ในพื้นที่ปลูกพืชไร่ของเกษตรกร เช่น ในแปลงมันสำปะหลัง หรือ อ้อย ทำให้ชั้นดินมีลักษณะแน่นทึบและแข็งมาก เนื้อดินมีช่องว่างสำหรับน้ำและอากาศน้อย เกิดชั้นดินดานขึ้น ในทางวิชาการมีการตรวจความหนาแน่นของดินโดยตรงที่ ระดับความลึกประมาณ 40-50 เซนติเมตร ถ้ามีความหนาแน่นเกินกว่า 1.6 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร แสดงว่ามีชั้นดินดาน สำหรับเกษตรกรสามารถตรวจสอบจากการสังเกตโดยวิธีง่ายๆ เช่น เวลาฝนตกลงมาพื้นที่ราบน้ำจะแช่ท่วมขังอยู่นานเนื่องจากไม่สามารถซึมลงไปในดิน ชั้นล่าง แต่จะไหลบ่าบนผิวดินทำให้เกิดการชะล้าง พังทลายบนผิวดิน

ดินดาน คือ ดินที่ถูกบดอัดแน่นจากการใช้เครื่องจักรกลหนักอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปี ทำให้เกิดการบดทับอัดแน่นทำให้เกิดชั้นดาน โดยเฉพาะดินที่อนุภาคทรายแป้งเป็นส่วนประกอบอยู่มาก เช่น ดินชุดกำแพงแสน เมื่อมีการไถพรวนไม่ถูกวิธี อนุภาคทรายแป้งจะตกอยู่ในชั้นดินลึกประมาณ 40-50 เซนติเมตร และถูกบดอัดทำให้เกิดชั้นดินดาน ชั้นดินดานนี้จะหนาหรือบางแล้วแต่ชั้นดินนั้นจะมีอนุภาคทรายแป้งมากหรือน้อยเพียงใดหรือเคยมีการไถระเบิดดินดานมาก่อนหรือไม่

พื้นที่ปลูกพืช ถ้ามีดินดานจะเป็นปัญหากับการปลูกพืช คือ ในฤดูฝนเมื่อมีฝนตกลงมา น้ำจะซึมลงไปในดินชั้นล่างไม่ได้ เนื่องจากมีดินดานมากั้นไม่ให้น้ำไหลซึมลงไปเก็บกักในดินชั้นล่างได้ ขณะเดียวกันในหน้าแล้งดินดานจะกั้นมิให้ความชื้นที่อยู่ข่างล่างขึ้นมาถึงรากพืช ทำให้พืชขาดน้ำและตายได้

จากปัญหาที่กล่าวไปแล้ว จำเป็นต้องมีการไถระเบิดดินดานตามความจำเป็น เพื่อมิให้เกิดชั้นดาน โดยการใช้ไถระเบิดดินดานด้วยไถสิ่ว เช่น พื้นดินที่ปลูกมันสำปะหลังอาจจะไถระเบิดดินดานปีเว้นปี ส่วนไร่อ้อยควรไถระเบิดดินดานช่วงรื้อตออ้อยทุกครั้ง คือประมาณ 3-4 ปีต่อครั้ง เพราะไร่อ้อยจะใช้เครื่องจักรกลหนักเข้าไปทำงาน ไม่ว่าจะเป็นรถแทรกเตอร์ รถบรรทุกอ้อย ซึ่งทำงานต่อเนื่องทุกปี ทำให้ดินเกิดการบดทับทุกปี จึงมีโอกาสเกิดชั้นดินดานสูง

ไถระเบิดดินดาน มีหลักการทำงานคือ ไถต้องจิกลงไปในดิน และถูกลากไปตลอดแนว ทำให้ดินแตกร่วนโดยไม่มีการพลิกดินเช่นไถหัวหมู หรือ ไถจาน คุณภาพของดินที่ต้องการจะขึ้นอยู่กับความลึก ระยะห่างระหว่างขา มุมของขา และความชื้นในดิน ชนิดของขาไถระเบิดดินดานแต่ละชนิด แสดงใน Figure 1 และการแตกตัวของดินเมื่อใช้งานไถระเบิดดินดาน แสดงใน Figure 2

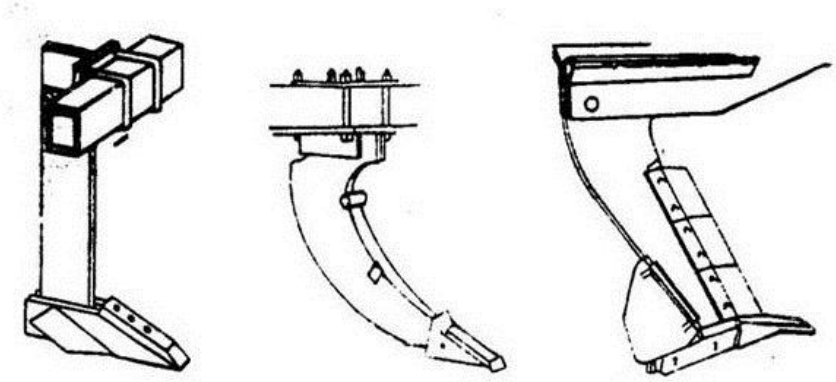


Figure 1 Three types of Subsoiling

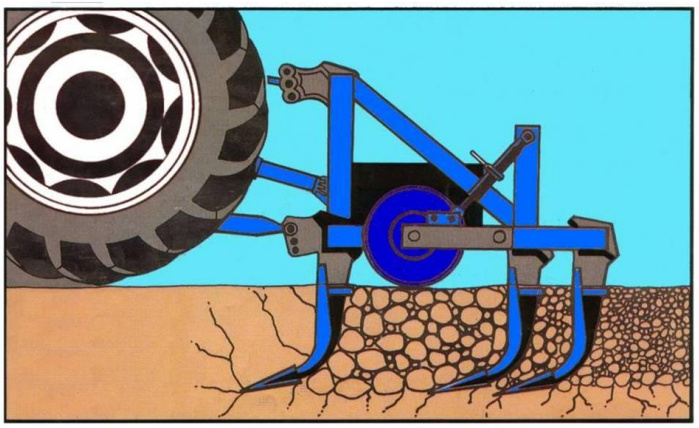


Figure 2 Soil loosen and break up by subsoiler

การไถระเบิดดินดาน จะทำการไถ 2 แนว ตัดกันเป็นตารางหมากรุก เนื่องจากการไถระเบิดดินดานเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายขึ้นมาอีก จึงไม่จำเป็นต้องไถระเบิดทุกปี อาจไถ 3-5 ปีต่อครั้ง ขึ้นอยู่กับชนิดของดินและวิธีเขตกรรม หลังจากไถระเบิดดินดาน ใช้ผาล 3 เพื่อพลิกดินให้กลบวัชพืช ทิ้งไว้ 5-7 วัน ไถพรวนด้วยผาล 7 เพื่อย่อยดินและกลบรอยไถระเบิดดินดาน ป้องกันการสูญเสียความชื้นจากใต้ดิน หากปลูกยกร่องก็ให้ยกร่องหลังจากพรวนดิน

ในปัจจุบันมีรถแทรกเตอร์ขนาดกลาง (49-50 แรงม้า) ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานไร่ แต่ไถระเบิดดินดานที่มีใช้งานส่วนใหญ่จะใช้กับรถแทรกเตอร์ขนาดใหญ่ และมีราคาแพง รวมถึงค่าจ้างในการระเบิดดินดานแต่ละครั้ง ราคาค่อนข้างสูง ถ้าเกษตรกรมีเครื่องมือที่เหมาะสมที่จะสามารถต่อพ่วงกับรถแทรกเตอร์ที่เกษตรกรมีใช้งานกันอย่างแพร่หลาย และราคาไม่สูงมาก ก็จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่ปลูกมันสำปะหลังเพื่อให้เข้าถึงการไถระเบิดดินดานด้วยตัวเอง

ดังนั้นสถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรมจึงมีแนวคิดที่จะวิจัยและพัฒนาไถระเบิดดินดานสำหรับติดพ่วงท้ายรถแทรกเตอร์ขนาดกลาง เพื่อให้สามารถใช้งานได้อย่างเหมาะสมกับพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง และ อ้อย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ออกแบบไถระเบิดดินดานสำหรับรถแทรกเตอร์ 49-50 แรงม้า

1.1 ออกแบบไถระเบิดดินดานสำหรับรถแทรกเตอร์ขนาดเล็ก ต้นแบบที่ 1

ได้ทำการสร้างต้นแบบ ไถระเบิดดินดาน สำหรับพ่วงรถแทรกเตอร์ขนาดกลางโดยไถระเบิดดินดานที่สร้างต้นแบบใช้เหล็กหนา 1.59 เซนติเมตร (5 หุน) ความยาวของไถตั้งแต่หูกระโจมถึงปลาย 100 เซนติเมตร มุมจิกของปลายใบมีด ที่ 30 องศา ด้านชุดไถจะมีการใส่ ซุปเปอร์ลีน ตามความโค้ง ของไถซึ่งชุดซุปเปอร์ลีนนี้จะช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่ของดินไม่ให้ไปประทะกับโครงไถ นอกจากนี้ยังมีปีกไถ เพื่อช่วยให้เกิดการแตกตัวของดินได้ดีอีกด้วย แสดงใน Figure 3

หลังจากนั้นนำไปทดสอบเบื้องต้นในแปลงของเกษตรกรใน จังหวัด ขอนแก่นพบว่าทำงานได้ ที่ความลึกในการไถที่ 35-40 เซนติเมตร Figure 4 และ Figure 5

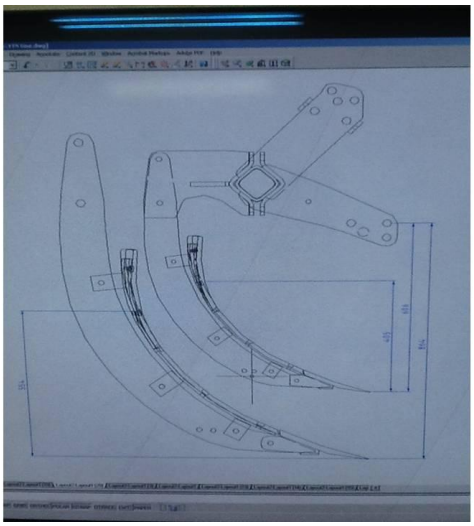


Figure 3 The shape of prototype I



Figure 4 Prototype I test



Figure 5 Working Depth of Prototype I

แต่เมื่อนำไปทดสอบกับชุดดินอื่นที่จังหวัดขอนแก่นในแปลงปลูกอ้อยพบว่า เกิดการบิดตัวของชุดไถระเบิดดินดานและ น้อตสำหรับยึดชุดโครงสร้างรับแรงไม่ไหวเกิดการขาดตัวของน้อต Figure 6



Figure 6 Deformation of Prototype I

1.2 ออกแบบไถระเบิดดินดานสำหรับรถแทรกเตอร์ขนาดเล็ก ต้นแบบที่ 2

ทำการออกแบบผาลไถระเบิดดินดาน โดยการเพิ่มขนาดเหล็กจาก 1.59 เซนติเมตร (5 หุน) เป็นขนาด 2.54 เซนติเมตร (1 นิ้ว) แล้วนำไปทดสอบในแปลงเกษตรกรปลูกอ้อย ที อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น ซึ่งดินที่ทดสอบเป็นดินทราย ที่ความชื้น 12.5 % พบว่าสามารถทำงานได้ที่ความลึก 40-45 เซนติเมตร Figure 7



Figure 7 Prototype II test

แต่เมื่อนำต้นแบบที่ 2 มาทดสอบในแปลงปลูกมันสำปะหลัง ที่ จ.นครราชสีมา ซึ่งเป็นดินร่วนเหนียวที่มีความชื้นดิน 13.5% พบว่า น้อตสำหรับรับแรงไถ ไม่สามารถทนแรงได้ เกิดการฉีกขาด และขาไถเกิดการบิดตัว Figure 8



Figure 8 Deformation of Prototype II

1.3 ออกแบบไถระเบิดดินดานสำหรับรถแทรกเตอร์ขนาดเล็ก ต้นแบบที่ 2

ทำการเพิ่มขนาดเหล็กที่นำมาใช้ทำขาไถเป็น 3.81 เซนติเมตร (1.5 นิ้ว) และเพิ่มขนาดน้อตเป็นน้อตขนาด 3.81 เซนติเมตร ด้วย นำมาทดสอบในชุดดินขอนแก่น ชุดดินนครราชสีมา ชุดดินบ่อพลอย พบว่าสามารถทำงานได้ดี ไม่มีความเสียหายเกิดขึ้น ซึ่งทั้งสามชุดดินที่ทดสอบสามารถทำการไถระเบิดดินดานได้ลึกถึง 40-45 เซนติเมตร



Figure 9 Prototype III test

ทดสอบต้นแบบที่ 2 ในแปลงเกษตรกร อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น พบว่า เมื่อลากไถระเบิดดินดานทำงาน ดินจะคอยดูดให้ไถจมลึกลงไปในดิน ทำให้กำลังของรถแทรกเตอร์ทำงานไม่ไหว ทำการแก้ไขโดยทำล้อควบคุมความลึกในการไถ (Figure 10) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมความลึกในการไถ ให้ไถระเบิดดินดานทำงานในความลึกที่ต้องการ



Figure 10 Depth Wheel

2. การทดสอบแรงฉุดลากในการไถระเบิดดินดาน

การทดสอบวัดแรงฉุดลาก ทำการทดสอบในแปลงปลูกอ้อยที่ อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม โดยใช้รถแทรกเตอร์ต้นกำลัง Messy 4245 ขนาด 90 แรงม้า ฉุดลาก รถแทรกเตอร์ Kioti EX 50 ขนาด 49 แรงม้า ที่ติดพ่วงไถระเบิดดินดาน Figure 11 โดยใช้ Load Cell ขนาด 5 ตันติดไว้ระหว่างรถแทรกเตอร์ทั้ง 2 คัน และใช้ Indicator Kyowa SLW 220 PC Figure 12 เป็นตัวอ่านค่าแรงที่ได้จากการไถ ดังแสดงในรูป



Figure 11 Measuring of Draft for a tractor mounted implement



Figure 12 Indicator Kyowa

การทดสอบวัดแรงฉุดลาก จะทำการทดสอบ ในหัวไถระเบิดดินดานที่หน้ากว้างการไถ 3 ระดับ คือ หน้ากว้างการระเบิดดินดาน 3.81, 6.35, 8.69 เซนติเมตร (หัวเล็ก, หัวกลาง, หัวใหญ่) ตามลำดับ และอุปกรณ์เสริมแตกต่างกัน 4 ระดับคือ A ไถระเบิดดินดานใส่ซุปเปอร์ลีน และ ปีกทั้งสองข้าง B ไถระเบิดดินดานใส่ ซุปเปอร์ลีน C ไถระเบิดดินดานใส่เฉพาะปีกทั้งสองข้าง D เฉพาะหัวระเบิดดินดาน

การทดสอบจะทำการวัดแรงฉุดลากโดย เริ่มต้น ให้รถคันหน้า ลาก รถคันหลังที่ยกไถดินดานขึ้น วัดค่าแรงฉุดลากที่ได้ หลังจากนั้น วัดแรงฉุดลาก โดยให้ไถระเบิดดินดานทำงาน ผลต่างของการลากไถทั้งสองค่า จะเป็นค่าแรงฉุดลากในการไถ

ในการทดสอบ เพื่อปรับสมดุลของการไถระเบิดดินดาน และ รถแทรกเตอร์ จึงจำเป็นต้องเพิ่มน้ำหนัก โดยการทดลองค่อยๆ เพิ่มน้ำหนักที่ด้านหน้าของรถแทรกเตอร์ จนได้น้ำหนักที่ไถระเบิดดินดานสามารถทำงานได้ในความลึกที่ต้องการ โดยน้ำหนักที่ทำการเพิ่มคือ 300 กิโลกรัม

Table 1 Draft force (Newton)

Level	small	medium	large
A	16,405	18,205	20,395
B	16,430	18,375	20,470
C	14,160	14,755	18,880
D	14,705	15,160	19,390

A ไถระเบิดดินดานใส่ซุปเปอร์ลีน และ ปีกทั้งสองข้าง

B ไถระเบิดดินดานใส่ ซุปเปอร์ลีน

C ไถระเบิดดินดานใส่เฉพาะปีกทั้งสองข้าง

D เฉพาะหัวระเบิดดินดาน

Small หน้ากว้างไถระเบิดดินดาน 3.81 เซนติเมตร

Medium หน้ากว้างไถระเบิดดินดาน 6.35 เซนติเมตร

Large หน้ากว้างไถระเบิดดินดาน 8.69 เซนติเมตร

Table 2 Power of Tractor N.m/s (HP)

Level	small	medium	large
A	13,288 (17.81)	14,564 (19.52)	16,112 (21.60)
B	13,308 (17.84)	14,883 (19.95)	16,785 (22.50)
C	11,044 (14.80)	11,804 (15.82)	14,664 (19.66)
D	12,058 (16.16)	12,431 (16.66)	15,512 (20.79)

Table 3 Working Depth (cm)

Level	small	medium	large
A	32	38	33
B	40	45	40
C	40	40	40
D	42	43	43

ผลการทดสอบไถระเบิดดินดาน ตามสภาวะต่างๆกันข้างต้น เพื่อศึกษาถึง แรงฉุดลาก ความลึกในการไถ การแตกตัวของดินภายหลังการไถระเบิดดินดาน พบว่า หัวเล็ก C มีการใช้แรงฉุดลากน้อยที่สุด มีความลึกในการระเบิดดินดานที่ 40 เซนติเมตร และมีการแตกตัวของดินดี ดังนั้น จึงเลือกใช้ หัวเล็ก C ในการเป็นต้นแบบสำหรับทดสอบในแปลงทดสอบ

3. ดำเนินการแก้ไขต้นแบบและนำต้นไปไปทดสอบในแปลงของเกษตรกรและเก็บข้อมูล

การทดสอบไถระเบิดดินดาน ทำการทดสอบในแปลงอ้อยที่พบว่ามีชั้นดินดานเกิดขึ้น การทดสอบทำการเก็บข้อมูลเพื่อหาความสามารถในการทำงาน ประสิทธิภาพการทำงานเชิงพื้นที่ อัตราการสิ้นเปลืองน้ำมันเชื้อเพลิง

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการตรวจเอกสาร

กระบวนการเกิดชั้นดินดานมี 3 ประเภท ดังรายละเอียดดังนี้

1. ชั้นดินดานแข็ง (duripan) เป็นชั้นดินแข็งเชื่อมกันแน่นโดยสารเชื่อม สารเชื่อมมีหลายชนิดและมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสารเชื่อม ได้แก่ เหล็ก คาร์บอเนต ซิลิก้า

2. ชั้นดินดานเปราะ (fragipan) เป็นชั้นดินดานที่มีความหนาแน่นสูงกว่าชั้นดินบนและล่าง ชั้นดินดานนี้เกิดจากการอัดตัวของดินเหนียว ทรายแป้ง และทราย มีการเชื่อมตัวกันแน่น เมื่อแห้งจะเปราะ เมื่อชื้นน้ำซึมผ่านได้ยาก

3. ชั้นดินดานไถพรวน (plowpan) เป็นชนิดเดียวกันกับชั้นดินดานเปราะ แต่ใช้เรียกเฉพาะชั้นดินดานที่เกิดจากการไถพรวนในระดับความลึกเดียวกันเป็นเวลานาน

กระบวนการเกิดชั้นดินดานไถพรวน

เกิดจากการไถพรวนในระดับความลึกเดียวกันเป็นเวลานาน โครงสร้างของดินแตกละเอียด เมื่อฝนตกทำให้อนุภาคของดินเหนียว ทรายแป้ง รวมทั้งอินทรียวัตถุถูกชะล้างมาสะสมกันได้ชั้นไถพรวน นอกจากนี้ยังมีแรงกดทับจากรถแทรกเตอร์ในการเตรียมดินจนถึงการเก็บเกี่ยว

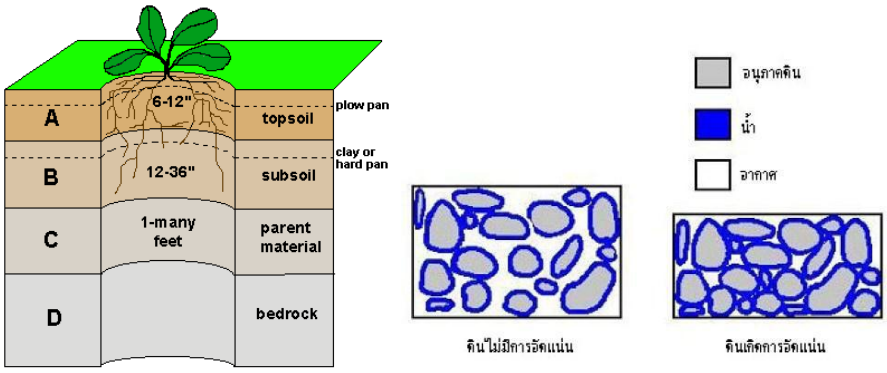


Figure 13 Hardpan in each layer

ชนิดและอุปกรณ์ของไถดินดาน

1. ไถดินดานชนิดธรรมดา (Subsoiler) ใช้ลากไปข้างหน้าให้เจาะลึกลงไปในดินด้วยรถแทรกเตอร์ที่มีกำลังสูง ซึ่งจะทำให้ชั้นดินล่างตั้งแต่ส่วนหัวเจาะขึ้นมาเกิดการแตกแยกและร่วนซุยขึ้น ระยะการแตกจะมีรัศมีที่จำกัดส่วนใหญ่ใช้ทำลายชั้นดานที่มักอยู่ใต้ชั้นที่ไถพรวนตามปกติลงไป ชั้นดานนี้จะสังเกตได้ง่ายๆ โดยมีสีซีดจางกว่า เนื่องจากมีอินทรียวัตถุน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณอื่นของดินหรือในขณะที่ขุดเจาะจะรู้สึกว่าดินส่วนนี้แข็งผิดปกติ วัตถุประสงค์หลักของไถดินดานก็เพื่อแก้ปัญหาเรื่องดังกล่าวเมื่อชั้นดานถูกทำให้แตกแยกระเบิดออกไปน้ำก็จะซึมผ่านลงได้สะดวก การถ่ายเทอากาศจะดีขึ้น และรากของพืชจะหยั่งลงได้ลึกและแผ่ไปได้ ดัง Figure 14

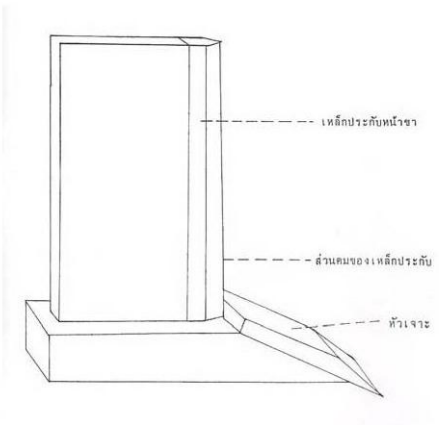


Figure 14 Normal subsoiler (Mongkol, 1987)

ขาของไถดินดานชนิดนี้ทำด้วยเหล็กหนาประมาณ 25 มม. และกว้าง 180 มม. ด้านหน้าของขาเป็นชิ้นเหล็กประกบตลอดแนวยาว ซึ่งถอดเปลี่ยนได้เมื่อสึกหรอที่ปลายด้านล่างของขาจะมีหัวเจาะยึดติดอยู่ หัวเจาะนี้จะมีขนาดกว้าง 50-120 มม. และยาวประมาณ 300-400 มม. มีมุมกดประมาณ 25-30 องศา มุมนี้มีความสำคัญยิ่งในการที่จะทำให้ชั้นดินที่อยู่เหนือขึ้นไปถูกงัดและแตกร่วนในขณะที่ถูกไถลากให้เคลื่อนที่ไปข้างหน้าลักษณะของพื้นที่หน้าตัดของดินบริเวณที่แตกและร่วนนั้น ชั้นดินที่แตกร่วนนี้จะพูนสูงขึ้นกว่าระดับผิวดินที่ยังไม่ถูกไถ บริเวณที่ดินแตกร่วนจะอยู่บริเวณใกล้กับหน้าดินส่วนบริเวณที่อยู่ชิดกับหัวเจาะจะแตกร่วนเพียงเล็กน้อย ดัง Figure 15 ดังนั้นประสิทธิภาพของไถดินดานชนิดนี้จึงค่อนข้างต่ำ

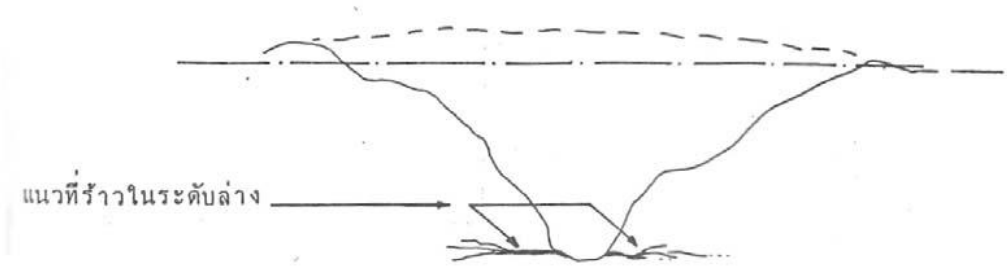


Figure 15 Soil Failer by subsoiler (Mongkol, 1987)

2. ไถดินดานชนิดติดปีก (winged subsoiler) จะช่วยให้การแตกร่วนของดินดีขึ้นมาก และมีบริเวณที่แตกร่วนมากขึ้น โดยใช้แรงฉุดลากเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

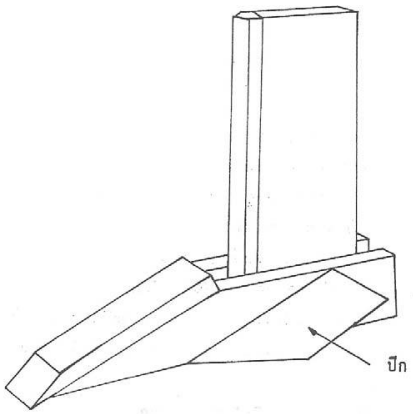


Figure 16 Subsoiler with wing (Mongkol, 1987)

2. การทดสอบไถระเบิดดินดานในแปลงทดสอบของเกษตรกร

การทดสอบไถระเบิดดินดานทำการทดสอบในแปลงเกษตรกร ปลูกอ้อย ที่ อ.บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น ที่ระดับดานลึก 35 เซนติเมตร ค่าความชื้นในการทดสอบ 14.53 % ทดสอบโดยใช้รถแทรกเตอร์ Kioti Ex 50 ขนาด 49 แรงม้า เป็นต้นกำลัง การเก็บข้อมูลการทดสอบเพื่อคำนวณหาความสามารถในการทำงาน ประสิทธิภาพการทำงานเชิงพื้นที่ อัตราการสิ้นเปลืองน้ำมันเชื้อเพลิง ผลการทดสอบเป็นดัง Table 4



Figure 16 Field test

Table 4 Result of the subsoiler test in the field

	Rep 1	Rep 2	Rep3
Area (rai)	0.5	0.5	0.5
Moving Speed of Tractor (km/hr)	2.88	2.88	2.88
Field efficiency (%)	72.69	68.74	70.71
Field capacity (rai/hr)	2.35	2.48	2.42
Fuel consumption (l/rai)	3.54	3.62	3.52
Working depth (cm)	42	40	42

สรุปผลการทดลอง

ไถระเบิดดินดานที่ออกแบบเป็นแบบ 2 ขา มีปีกสองข้าง ขนาดขาไถยาว 1 เมตร ที่ปลายขาไถมีเหล็กสำหรับระเบิดดินดานมีขนาด 1.5 นิ้ว ทดสอบไถระเบิดดินดานที่ระดับดินดานลึก 35 เซนติเมตร ในแปลงของเกษตรกรปลูกอ้อย ที่ อ. บ้านไผ่ จ. ขอนแก่น พบว่า สามารถระเบิดดินดานได้ ที่ความชื้นดิน 14.53 % โดยไถได้ที่ความลึกเฉลี่ย 41 เซนติเมตร มีความสามารถในการทำงานเฉลี่ย 2.42 ไร่/ชม. มีประสิทธิภาพการทำงานเชิงพื้นที่เฉลี่ย 70.71% ใช้น้ำมันเชื้อเพลิงเฉลี่ย 3.56 ลิตร/ไร่

สำหรับในการไถระเบิดดินดาน ในไร่มันสำปะหลังนั้น จะช่วยทำลายชั้นดินดาน ทำให้มันสำปะหลังเพิ่มผลผลิต แต่ชาวไร่ส่วนใหญ่ไม่มีรถแทรกเตอร์ขนาดใหญ่เพราะมีราคาแพง จึงได้ออกแบบไถระเบิดดินดานให้ใช้กับรถแทรกเตอร์ขนาดเล็ก 49-50 แรงม้า ซึ่งราคาถูกกว่ารถแทรกเตอร์ขนาดใหญ่ เหมาะกับชาวไร่มันสำปะหลังที่ส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อย การทดสอบพบว่ามีความสามารถในการทำงาน 2.5 ไร่/ชั่วโมง อัตราการใช้น้ำมันเชื้อเพลิง 3.0 ลิตร/ไร่ แต่ถ้าเกษตรกร มีรถแทรกเตอร์ขนาด 36 แรงม้า ก็สามารถ ถอดขาไถระเบิดดินดานให้เหลือเพียงหนึ่งขา ก็สามารถใช้ต้นกำลังรถแทรกเตอร์ขนาดดังกล่าว ไถระเบิดดินดานในแปลงปลูกมันสำปะหลังได้

การนำไปใช้ประโยชน์

ปัจจุบัน มีห้างหุ้นส่วนจำกัด ศรีกำแพงแสนมอเตอร์ นำต้นแบบไปผลิตจำหน่ายเชิงพาณิชย์แล้ว มีเกษตรกรสนใจซื้อไปใช้งานแล้วจำนวนหนึ่ง



Figure 17 Subsoiler Attach with tractor 36 (left) and 50 hp (Right)



Figure 18 Field day

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณกิตติพิชญ์ อึงสถิตย์ถาวร เกษตรกรไร่อ้อย และ มันสำปะหลัง ใน จ.ขอนแก่น ซึ่งได้ช่วยอำนวยความสะดวกในการทดสอบ ให้สถานที่ในการทดสอบ ขอขอบคุณ ข้าราชการ และลูกจ้าง สถาบันวิจัยเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร เจ้าหน้าที่ หจก. ศรีกำแพงแสนมอเตอร์ ทุกท่านที่ได้ร่วมมือในการสร้างและทดสอบไถระเบิดดินดานสำหรับรถแทรกเตอร์ขนาดกลาง จนงานวิจัยลุล่วง

เอกสารอ้างอิง

มงคล กวางวโรภาส. 2530. เครื่องทุ่นแรงในฟาร์ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท ประชาชน จำกัด (แผนกการพิมพ์), กรุงเทพฯ.

หมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม “พันธุ์นครสวรรค์ 3”

Maize Seed Village “Nakhon Sawan 3”

ชุติมา คชวัฒน์ [1/] พิเชษฐ์ กรุดลอยมา [1/] อมรา ไตรศิริ [2/]
ประยูร สมฤทธิ์ [5/] เพ็ญรัตน์ เทียมเพ็ง [3/] โสพิศ ใจปาละ [4/] สยาม แซ่เฮ้อ [5/] สุรศักดิ์ วัฒนพันธุ์สอน [6/]
จิตอาภา จิจุบาล [7/] ปริยา รัตนวิชัย [8/] ว่าที่ร้อยตรี ชัยกฤต พรมมา [9/]
Chutima Koshawatana [1/] Pichet Grudloyma [1/] Amara Traisiri [2/]
Prayoon Somrith [5/] Penrat Thempeng [3/] Sopit Jaipala [4/] Siam Saehue [5/] Surasak Wattanapansorn [6/]
Jitapa Chichuban [7/] Parisa Ruttanawichai [8/] Chaiyakit Promma [9/]

ABSTRACT

In 2010, the new drought tolerant hybrid maize “Nakhon Sawan 3” was released by the Department of Agriculture. However, seed dissemination to small farmers was very limited to only 20 tons a year. Thus, accession to the hybrid variety and seed was quite difficult for farmers. Consequently, Field and Renewable Energy Crops Research Institute (FCRI) collaborated with Nakhon Sawan Field Crops Research Center setting up the project “Maize Seed Village” then networking with the Agricultural Research and Development Centers (ARDC) to improve seed dissemination concomitant with improving farmer skill on hybrid seed production. The project was launched in 2013-2015 with financial support from

[1] สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน 50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทม.10900
Field and Renewable Energy Crops Research Institute 50 Phaholyothin Road, Chatuchak, Bangkok 10900
[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ 60190
Nakhon Sawan Field Crops Research Center
[3] ศูนย์วิจัยพืชไร่เพชรบูรณ์ อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์ 67000
Petchabun Field Crops Research Center
[4] ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Chiangmai Field Crops Research Center
[5] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรตาก อ.เมือง จ.ตาก 63000
Tak Agricultural Research and Development Center
[6] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุโขทัย อ.ศรีสำโรง จ.สุโขทัย 64120
Sukhothai Agricultural Research and Development Center
[7] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรที่สูงเพชรบูรณ์ อ.เขาค้อ จ.เพชรบูรณ์ 67270
Petchabun Agricultural Research and Development Center
[8] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรนครสวรรค์ อ.ตากฟ้า จ.นครสวรรค์ 60190
Nakhon Sawan Agricultural Research and Development Center
[9] ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อ. ฝาง จ.เชียงใหม่ 50110
Chiangmai Agricultural Research and Development Center

"DOA Agricultural Budget"; the aim was to disseminate "Nakhon Sawan 3" hybrid, to promote farmers producing the seed for their own use to reduce cost of seed purchasing and to have sufficient seed spared in case of crop loss. Moreover, farmers could produce for community and earned more income. The most important is to promote sustainability of maize production. Production areas were in 5 provinces i.e. Nakhon Sawan, Petchabun, Chiangmai, Tak and Sukhothai; 97 farmers in 40 villages produced the seed in 320 rai. Ninety-seven tons of seed valued of 6.8 million baht were produced; 12.8 tons seed were kept for the next season planting. Eighty-two tons of seed was sold and estimated income was 3.8 million baht. Planting areas of hybrid maize was 32,000 rai producing 22,400 tons of grain to local trade approximately 135 million baht.

Key-words : maize, hybrid, Nakhon Sawan 3, seed production, seed village

บทคัดย่อ

ในปี 2553 กรมวิชาการเกษตรรับรองพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม ผลผลิตสูง ทนทานแล้ง พันธุ์ นครสวรรค์ 3 แต่มีปริมาณการผลิตเมล็ดพันธุ์เพียงปีละ 20 ตัน ทำให้เกษตรกรเข้าถึงพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ได้ยาก สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานจึงร่วมกับศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์และศูนย์วิจัยฯ ที่เกี่ยวข้อง พัฒนาประสิทธิภาพการบริการด้านพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ พร้อมกับพัฒนาศักยภาพเกษตรกร ด้วยการจัดทำโครงการหมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ดำเนินการปี 2556-2558โดยได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้การดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เอง เพื่อลดค่าใช้จ่ายด้านเมล็ดพันธุ์ มีเมล็ดพันธุ์สำรองเมื่อเกิดภัยธรรมชาติ สามารถผลิตและกระจายสู่ชุมชนเพื่อสร้างรายได้ และความยั่งยืนในการผลิตข้าวโพด พื้นที่ดำเนินการ 5 จังหวัด ได้แก่ นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ ตาก และสุโขทัย มีเกษตรกรร่วมดำเนินการในปี 2555/56 จำนวน 97 รายใน 40 หมู่บ้าน ในพื้นที่ 321 ไร่ และปี 2556/57 จำนวน 53 รายใน 30 หมูบ้าน พื้นที่ 195 ไร่ รวมพื้นที่ปลูกทั้งหมด 516 ไร่ ได้เมล็ดพันธุ์คุณภาพดีจำนวน 97 ตัน คิดเป็นมูลค่า 6.8 ล้านบาท เกษตรกรเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ปลูกเอง 12.8 ตัน จำหน่าย 84.2 ตัน ทำให้มีรายได้จากการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ 3.8 ล้านบาท เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้นำไปปลูกต่อในพื้นที่ 32,000 ไร่ ได้เมล็ดสู่ท้องถิ่น 22,400 ตันมูลค่า 135 ล้านบาท

คำหลัก : ข้าวโพด ลูกผสม นครสวรรค์ 3 ผลิตเมล็ดพันธุ์ หมู่บ้านเมล็ดพันธุ์

คำนำ

ปัจจุบันการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศทำให้การผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์เสี่ยงต่อสภาพฝนแล้งหรือน้ำท่วมทำความเสียหายต่อข้าวโพด การไถทิ้งแล้วปลูกใหม่เป็นการเพิ่มต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ ในขณะที่ต้นทุนการผลิตอื่นๆได้แก่ ปุ๋ย และสารเคมีก็มีราคาสูงขึ้น ขณะเดียวกันกระทรวงเกษตรและ

สหกรณ์มักได้รับการร้องเรียนและการตั้งกระทู้ถามถึงแนวทางแก้ไขปัญหาเมล็ดพันธุ์ราคาแพง รวมทั้งวิธีการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมใช้เองของกลุ่มเกษตรกร เพื่อลดต้นทุนการผลิตและเป็นการเพิ่มศักยภาพของเกษตรกรในการพึ่งพาตนเองด้วย

ปี 2553 กรมวิชาการเกษตรรับรองพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมเดี่ยว ผลผลิตสูง ทนทานแล้ง พันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ดำเนินการวิจัยและพัฒนาพันธุ์ (พิเชษฐ์ และคณะ, 2552) พร้อมทั้งมีเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์ (ชุติมา และคณะ, 2550) ซึ่งเกษตรกรสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เอง ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ผลิตเมล็ดพันธุ์ได้ปริมาณจำกัดเพียงปีละ 20 ตัน และช่องทางการกระจายพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ไม่กว้างขวาง ดังนั้น ในปี 2556-2558 สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานจึงร่วมกับศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรฯ ที่เกี่ยวข้อง พัฒนาการบริการด้านพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ พร้อมกับพัฒนาศักยภาพเกษตรกร ด้วยการจัดทำโครงการหมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 ขยายผลจากความร่วมมือระหว่างกรมวิชาการเกษตรและสถาบันพัฒนาชนบท สาธารณรัฐเกาหลี ภายใต้โครงการเสริมสร้างความร่วมมือด้านอาหารและเกษตรแห่งอาเซียน (Asian Food & Agriculture Cooperation Initiative, AFACI) ชื่อโครงการหมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในประเทศไทย ปี 2553-2556 (Koshawatana *et al.* 2013)

สำหรับโครงการหมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม พันธุ์นครสวรรค์ 3 สนับสนุนโดยเงินรายได้การดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร มีวัตถุประสงค์เพื่อกระจายพันธุ์ข้าวโพดของทางราชการให้เกษตรกรใช้อย่างกว้างขวางยิ่งขึ้น และตอบโจทย์เกษตรกรที่ต้องการผลิตเมล็ดพันธุ์ราคาไม่แพงใช้เอง มีเมล็ดพันธุ์สำรองเมื่อเกิดภัยธรรมชาติ โดยมีเกษตรกรเป็นเครือข่ายการผลิต จึงเพิ่มศักยภาพเกษตรกรให้สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์สู่ชุมชน สร้างรายได้ และความยั่งยืนในการผลิต เกษตรกรคนเก่งพัฒนาเป็นต้นแบบแก่เพื่อนบ้าน ขณะเดียวกันกรมวิชาการเกษตรสามารถให้บริการด้านพันธุ์และกระจายพันธุ์เพิ่มขึ้นโดยผ่านระบบเครือข่ายเกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีการ

ขั้นตอนดำเนินงาน

1. เสวนาเกษตรกร

ติดต่อประสานงานกับกับผู้ดำเนินโครงการงาน เกษตรกรต้นแบบ และเกษตรกรรายใหม่ เพื่อจัดเสวนาแสดงให้เห็นความสำคัญถึงประโยชน์ที่จะเกิดร่วมกัน จากการดำเนินงาน รู้ถึงความต้องการพันธุ์ และปริมาณเมล็ดพันธุ์

2. ผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดสายพันธุ์แท้พันธุ์แม่ ตากฟ้า 1 และพันธุ์พ่อ ตากฟ้า 3

ผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดสายพันธุ์แท้ ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม นครสวรรค์ 3 โดย ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ผลิตเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์แท้พันธุ์แม่

ตากฟ้า 1 พื้นที่ 12 ไร่ เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์สายพันธุ์แท้พันธุ์แม่ 3,000 กิโลกรัม และสายพันธุ์แท้พันธุ์พ่อตากฟ้า 3 พื้นที่ 4 ไร่ เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์จำนวน 1,000 กิโลกรัม

3. ทดสอบพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แบบเกษตรกรมีส่วนร่วม

เกษตรกรต้นแบบทำแปลงทดสอบพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 เพื่อประเมินศักยภาพการเจริญเติบโตผลผลิต และการให้ผลผลิต เปรียบเทียบกับพันธุ์การค้าที่เกษตรกรนิยมปลูก พื้นที่รายละ 1 ไร่

4. ทำแปลงต้นแบบการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม นครสวรรค์ 3

เกษตรกรต้นแบบจัดทำแปลงต้นแบบเพื่อเป็นตัวอย่างแก่เพื่อนบ้าน และเกษตรกรในหมู่บ้านใกล้เคียงในการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 และเรียนรู้ศักยภาพการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของสายพันธุ์แท้ โดยเกษตรกรต้นแบบแต่ละรายทำแปลงต้นแบบการผลิตเมล็ดพันธุ์พื้นที่ 1 ไร่ โดยปลูกสายพันธุ์แท้พันธุ์แม่ 4 แถวสลับกับสายพันธุ์พ่อ 1 แถว ดูแลรักษาตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร กำจัดช่อดอกตัวผู้ในแถวสายพันธุ์แท้พันธุ์แม่เมื่อช่อดอกตัวผู้เริ่มเจริญจากใบธง กำจัดต้นปลอมปน และตัดแถวสายพันธุ์แท้พันธุ์พ่อทิ้งหลังการผสมเกสร จัดกิจกรรมนำเกษตรกรเยี่ยมชมแปลง เพื่อแลกเปลี่ยนประสบการณ์ระหว่างเกษตรกร

5. คัดเลือกเกษตรกรร่วมโครงการ ถ่ายทอดความรู้การผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม นครสวรรค์ 3

จากผลการดำเนินงานในระยะแรกซึ่งเป็นความร่วมมือกับสาธารณรัฐเกาหลี ปี 2553-2556 แสดงให้เห็นว่าเกษตรกรสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมไว้ใช้เองได้ ทำให้สามารถลดต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ได้ถึงร้อยละ 40 และข้าวโพดพันธุ์นี้เจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากพันธุ์การค้าทั่วไป ทำให้เกษตรกรข้างเคียงสนใจเข้าร่วมโครงการ และมีเกษตรกรที่สามารถเป็นต้นแบบ จึงได้จัดประชุมกลุ่มเกษตรกร 5 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ สุโขทัย เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ และตาก คัดเลือกเกษตรกรและ/หรือกลุ่มเกษตรกรที่สนใจถ่ายทอดความรู้ ให้คำแนะนำเทคโนโลยีการผลิตแก่เกษตรกรในช่วงก่อนฤดูปลูก

6. เกษตรกรทำแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม นครสวรรค์ 3

เกษตรกรผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 ใช้เอง และจำหน่ายให้เกษตรกรรายอื่นใช้ในชุมชน โดยซื้อเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์แท้พันธุ์พ่อและพันธุ์แม่เพื่อปลูกเป็นแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์รายละ 1-5 ไร่ ตามศักยภาพการผลิตของแต่ละราย เกษตรกรจัดหาปัจจัยการผลิตเอง โดย ศวร.นครสวรรค์ วิเคราะห์ดินเพื่อแนะนำการใช้ปุ๋ยอย่างถูกต้องและเหมาะสมกับชนิดของดิน ติดตามตรวจแปลงและให้คำแนะนำตลอดกระบวนการผลิต

7. ประเมินความพึงพอใจการผลิตเมล็ดพันธุ์ และการปลูกเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ในฤดูถัดไป

ประเมินความพึงพอใจของผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ และผู้นำเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ไปปลูกต่อในฤดูถัดไป และรับฟังปัญหาอุปสรรคและข้อเสนอแนะเพื่อปรับปรุงการดำเนินงาน โดยการสัมภาษณ์

เกษตรกรหลังเสร็จสิ้นการเก็บเกี่ยวแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ และแปลงพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการนำเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ไปปลูกต่อ

8. รายงานความก้าวหน้าและสรุปผล

บันทึกข้อมูลผลการดำเนินงาน วิเคราะห์ และแปลผลข้อมูล วิเคราะห์และกำหนด แนวทางการปรับปรุงวิธีดำเนินงาน และข้อเสนอแนะสำหรับการดำเนินโครงการต่อไป

ระยะเวลาดำเนินงาน ตั้งแต่ ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กุมภาพันธ์ 2558

สถานที่ดำเนินงาน 5 จังหวัด ได้แก่ นครสวรรค์ เพชรบูรณ์ เชียงใหม่ สุโขทัย และตาก

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เสวนาเกษตรกร

จัดเสวนาเกษตรกร 13 ครั้งและร่วมหารือ 3 ครั้ง มีเกษตรกรร่วมเสวนาน้อยที่สุด 14 ราย และมากที่สุด 92 ราย จากพื้นที่ต่างๆ รวม 41 หมู่บ้าน จากพื้นที่ 17 ตำบล 8 อำเภอ ใน 5 จังหวัด (Table1) พบว่า เกษตรกรสนใจผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม เพราะเห็นว่าช่วยลดต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ แต่ยังไม่มีองค์ความรู้เกี่ยวกับวิธีการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม บางหมู่บ้านยังไม่รู้จักพันธุ์ข้าวโพดนครสวรรค์ 3 สำหรับกลุ่มเกษตรกรจังหวัดเชียงใหม่รายเดิมเสนอให้พัฒนาสายพันธุ์พ่อให้โปรยละอองนานขึ้นในสภาพอากาศหนาวเย็น

2. ผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดสายพันธุ์แท้พันธุ์แม่ ตากฟ้า 1 และสายพันธุ์แท้พันธุ์พ่อ ตากฟ้า 3

ศวร. นครสวรรค์ ผลิตเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์แท้พันธุ์แม่ ตากฟ้า 1 จำนวน 3,000 กิโลกรัม และสายพันธุ์แท้พันธุ์พ่อ ตากฟ้า 3 จำนวน 1,000 กิโลกรัม จำหน่ายสายพันธุ์แท้แก่เกษตรกรที่ร่วมโครงการเป็นสายพันธุ์แท้พันธุ์แม่ 1,791 กิโลกรัม และสายพันธุ์แท้พันธุ์พ่อ 612 กิโลกรัม

3. ทดสอบพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์แบบเกษตรกรมีส่วนร่วม

ในฤดูแล้งปี 2555/56 เกษตรกรทำแปลงทดสอบเพื่อเปรียบเทียบพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมนครสวรรค์ 3 กับพันธุ์การค้าจำนวน 2 แปลง รวม 19 ไร่ แบ่งเป็น จังหวัดตาก 1 แปลงพื้นที่ 10 ไร่ และจังหวัดเพชรบูรณ์ 1 แปลงพื้นที่ 9 ไร่ ในฤดูฝนปี 2556 เกษตรกรปลูกแปลงต้นแบบทดสอบพันธุ์ 2 แปลง พื้นที่ 21 ไร่ แบ่งเป็นจังหวัดนครสวรรค์ 1 แปลงพื้นที่ 15 ไร่ จังหวัดสุโขทัย 1 แปลง พื้นที่ 6 ไร่ และปลูกแปลงสาธิตพันธุ์นครสวรรค์ 3 ณ จังหวัดนครสวรรค์ 1 แปลงพื้นที่ 20 ไร่ พบว่า การเจริญเติบโตและผลผลิตของข้าวโพดลูกผสมมีศักยภาพการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตใกล้เคียงกับพันธุ์การค้าที่เกษตรกรนิยมปลูก

4. ทำแปลงต้นแบบการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม นครสวรรค์ 3

เกษตรกรต้นแบบทั้งสิ้น 9 ราย พื้นที่แปลง 52 ไร่ แบ่งเป็นปีที่ 1 จำนวน 22 ไร่ ปีที่ 2 จำนวน 30 ไร่ เกษตรกรไม่สะดวกทำแปลงต้นแบบรายละ 1 ไร่ซึ่งต้องปลูกแยกแปลง จึงใช้พื้นที่ทั้งหมดของแต่ละรายเป็นแปลงต้นแบบ เกษตรกรจังหวัดตากพัฒนาเทคนิคจนได้ผลผลิตเมล็ดพันธุ์ 450 กิโลกรัมต่อไร่ สำหรับรายที่ได้ผลผลิตต่ำประสบอากาศหนาวจัดระยะเจริญเติบโต หรืออากาศร้อนจัดในระยะออกดอก (Table2)

5. คัดเลือกเกษตรกรเข้าร่วมโครงการและถ่ายทอดความรู้การผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

ฤดูแล้งปี 2555/56 มีเกษตรกร 97 รายจาก 40 หมู่บ้านใน 5 จังหวัด ทำแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ 320 ไร่ ฤดูฝนปี 2556 มีเกษตรกร 10 รายจาก 2 หมู่บ้านในจังหวัดเชียงใหม่ทำแปลง 37 ไร่ และฤดูแล้งปี 2556/57 มีเกษตรกร 43 รายจาก 28 หมู่บ้าน ใน 5 จังหวัด ทำแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ 158 ไร่ (Table3) มีการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับลักษณะสายพันธุ์แท้ วิธีการปลูก การกำจัดเกสรตัวผู้ในแถวแม่ การตัดต้นปลอมปน การเก็บเกี่ยว ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ปฏิบัติตาม มีบางรายที่ไม่ตัดแถวพ่อทิ้งเนื่องจากเพิ่มค่าแรงงาน พื้นที่ปลูกในปีที่ 2 ลดลงเนื่องจากการผลิตไม่เป็นไปตามวัตถุประสงค์เพราะเกษตรกรที่จังหวัดสุโขทัยปลูกข้าวในฤดูฝน แต่เป็นกลุ่มเกษตรกรที่มีศักยภาพผลิตเนื่องจากมีประสบการณ์ผลิตเมล็ดพันธุ์ให้กับบริษัท

6. เกษตรกรทำแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม พันธุ์นครสวรรค์ 3

เกษตรกรที่คัดเลือกเข้าร่วมโครงการในข้อ 5 ดำเนินการผลิตเมล็ดพันธุ์ (Table3) พบว่า พื้นที่ผลิตในฤดูแล้งมากกว่าเนื่องจากเกษตรกรต้องการเมล็ดพันธุ์เพื่อปลูกในฤดูฝนปีถัดไป มีการผลิตในฤดูฝนเล็กน้อยแต่ประสบปัญหาฝนตกในระยะโปรยละอองเกสรและในระยะเก็บเกี่ยวที่ทำให้ข้าวโพดเปียกฝน ได้เมล็ดพันธุ์จากการผลิต 3 ฤดู จำนวน 97 ตัน ประมาณราคาที่เกษตรกรจำหน่าย 70 บาทต่อกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าเมล็ดพันธุ์ 6.8 ล้านบาท เกษตรกรเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้ปลูกเอง 12.8 ตัน จำหน่าย 84.2 ตัน ประมาณรายได้จากการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ 3.8 ล้านบาท (Table4) หากประเมินจากเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้จะสามารถปลูกต่อได้ในพื้นที่ 32,000 ไร่ ได้เมล็ดข้าวโพดสู่พ่อค้าท้องถิ่น 22,400 ตัน มูลค่า 135 ล้านบาท

ผลผลิตต่อไร่ที่เกษตรกรผลิต พบว่า มีการกระจายตั้งแต่ 15-560 กิโลกรัมต่อไร่ การที่ผลผลิตต่อไร่สูงเนื่องจากการเจริญเติบโตไม่กระทบอากาศร้อนจัดหรือหนาวจัดในระยะผสมเกสร การเตรียมแปลงและการดูแลรักษาดี บางพื้นที่พัฒนาเทคนิคการปลูกแทรกแถวเช่น จังหวัดตาก สำหรับกรณีผลผลิตต่อไร่ต่ำเกิดจากกระทบอากาศเย็นระยะแรกของการเจริญ และช่วงผสมเกสร การกระทบอากาศร้อนระยะออกดอก การผลิตฤดูฝนมีปัญหาฝนตกในระยะโปรยละอองเกสรและเปียกฝนในระยะเก็บเกี่ยว ทำให้มีเชื้อราเข้าทำลายเมล็ด ต้นทุนต่อไร่ที่เป็นเงินสดมีค่าเฉลี่ย 5,054-7,992 บาทต่อไร่ หรือ 19-100 บาทต่อกิโลกรัม (Table4) ต้นทุนต่อกิโลกรัมจะสูงหรือต่ำนั้นขึ้นกับผลผลิตต่อไร่ แม้ต้นทุนต่อไร่เท่ากันแต่ถ้าได้ผลผลิตต่อไร่สูงจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่อกิโลกรัมต่ำลง หากประมาณต้นทุนการผลิต 80 บาทต่อกิโลกรัมเมื่อเทียบกับการซื้อเมล็ดพันธุ์มาปลูกราคา 150 บาทต่อ

กิโลกรัม จะทำให้เกษตรกรสามารถลดต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ได้ถึงร้อยละ 50 คิดเป็นลดลง 70 บาทต่อกิโลกรัมหรือ 210 บาทต่อไร่ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำเร็จของโครงการนี้ในการช่วยลดต้นทุนการผลิตค่าเมล็ดพันธุ์

7. ประเมินความพึงพอใจการผลิตเมล็ดพันธุ์ และการปลูกเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ในฤดูถัดไป

ความพึงพอใจการผลิตเมล็ดพันธุ์

เกษตรกรพึงพอใจเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์ในระดับมากถึงมากที่สุด (ระดับ 4-5) ตั้งแต่การเตรียมแปลง การปลูก การตัดพันธุ์ปน การกำจัดช่อดอกตัวผู้ในแถวแม่ การเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะคุณภาพความงอก ทั้งนี้อาจเนื่องจากการผลิตในปริมาณน้อยทำให้การลดความชื้น ปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์มีประสิทธิภาพ บางรายพอใจคุณภาพในระดับเล็กน้อย เนื่องจากผลิตในฤดูฝน มีฝนในระยะเก็บเกี่ยว เกษตรกรยังเห็นว่าการผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เองช่วยลดต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ และเห็นด้วยกับการผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เอง (Table5)

ความพึงพอใจการปลูกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม

เกษตรกรพึงพอใจศักยภาพของพันธุ์ในระดับมากถึงมากที่สุด (ระดับ 4-5) เรียงลำดับจาก สีเมล็ด สีใบ ความแข็งแรงของลำต้น เก็บเกี่ยวง่าย ความแข็งแรงของต้นกล้าหลังปลูก และการประหยัดค่าเมล็ดพันธุ์ สำหรับลักษณะอื่นก็อยู่ในเกณฑ์พอใจเช่นเดียวกัน (Table 5) ดังนั้นเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจึงยอมรับทั้งพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์

ความพึงพอใจการบริการของโครงการหมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

เกษตรกร 50 รายจาก 8 จังหวัด มากกว่าร้อยละ 90 พึงพอใจต่อการบริการ (ระดับพอใจ-พอใจมาก) โดยค่าเฉลี่ยความพึงพอใจในภาพรวมร้อยละ 87.44 (Table 6) ซึ่งสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานได้เสนอโครงการหมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 เป็นตัวชี้วัดความพึงพอใจของผู้รับบริการในการจัดทำคำรับรองการปฏิบัติราชการของหน่วยงานประจำปี พ.ศ. 2556

สรุปผลการทดลอง

1. กรมวิชาการเกษตรสามารถให้บริการพันธุ์และเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 แก่เกษตรกร เฉลี่ยจากเดิมปีละ 20 ตันเป็น 68 ตัน โดยถ่ายทอดเทคโนโลยีด้านพันธุ์และการผลิตเมล็ดพันธุ์แก่เกษตรกร ได้เมล็ดพันธุ์คุณภาพดี 97 ตัน มูลค่า 6.8 ล้านบาท

2. เกษตรกรมีเมล็ดพันธุ์ไว้ปลูกเอง 12.8 ตัน ประมาณพื้นที่ปลูกต่อ 32,000 ไร่ ได้เมล็ดข้าวโพดสู่ท้องถิ่น 22,400 ตัน มูลค่า 135 ล้านบาท เมล็ดพันธุ์ส่วนเกินจำหน่ายได้ 84.2 ตัน ประมาณรายได้เกษตรกรจากการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์รวม 3.8 ล้านบาท

3. เกษตรกรรับรู้และยอมรับพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสม นครสวรรค์ 3 มีความพึงพอใจศักยภาพของพันธุ์และเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์ในระดับมากถึงมากที่สุด และเห็นด้วยกับการผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้

เองเพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย ช่วยพัฒนาองค์ความรู้แก่ตน ชุมชน และเพิ่มรายได้ การเป็นเกษตรกรต้นแบบเป็นการส่งต่อองค์ความรู้แก่เพื่อนบ้าน เกิดความภาคภูมิใจ

การนำไปใช้ประโยชน์

1. การบริการด้านเมล็ดพันธุ์ เป็นการเพิ่มช่องทางใหม่ในการให้บริการจากเดิมที่ภาครัฐเป็นผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์จำหน่ายโดยตรงเพียงช่องทางเดียว เพิ่มช่องทางโดยให้เกษตรกรเป็นผู้ผลิตโดยมีภาครัฐเป็นผู้กำกับและผู้ส่งเสริม ทำให้สามารถขยายการผลิตไปยังพื้นที่อื่นที่มีความพร้อมและเหมาะสมได้

2. การบริการทางวิชาการ เป็นช่องทางนำผลงานวิจัยสู่การนำไปใช้ประโยชน์โดยถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตเมล็ดพันธุ์และเผยแพร่พันธุ์ซึ่งเป็นผลงานวิจัยของกรมวิชาการเกษตรสู่ผู้ใช้ประโยชน์โดยตรง นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกษตรกรตื่นตัวในการผลิต การสร้างกลุ่ม และตระหนักรู้ถึงศักยภาพของตนเอง ทำให้เกิดเครือข่ายภายในกลุ่มเกษตรกร และความพยายามในการสร้างความยอมรับของเกษตรกรต้นแบบต่อเมล็ดพันธุ์และพันธุ์ที่ตนเองผลิต

3. การผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เองทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นและลดต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ไร่ละ 210 บาท รายได้จากการจำหน่ายเมล็ดพันธุ์ให้เพื่อนบ้านต่ำสุดครัวเรือนละ 3,000 บาท และสูงสุดครัวเรือนละ 200,000 บาท ซึ่งเป็นแนวทางการเพิ่มรายได้และลดต้นทุนการผลิตให้เกษตรกรตามนโยบายรัฐบาลที่สามารถดำเนินการและขยายผลได้ง่าย

4. ผลของโครงการทำให้เกิดเกษตรกรต้นแบบและแปลงต้นแบบ ที่เป็นแหล่งเรียนรู้และศึกษาดูงานของเกษตรกร และหน่วยงานต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ เป็นต้นแบบในการนำไปพัฒนาโครงการในพื้นที่ต่างๆ

5. พัฒนาศักยภาพของเกษตรกร สร้างชุมชนเข้มแข็ง ส่งเสริม “ทุนความรู้” และ “ทุนสังคม” เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ที่เกษตรกรใช้มากกว่าร้อยละ 95 มาจากภาคเอกชนซึ่งเป้าหมายทางธุรกิจคือผลตอบแทนสูงสุดและการส่งออก ดังนั้นจึงเป็นหน้าที่ของภาครัฐในการผลิตเมล็ดพันธุ์ไว้เป็นกันชน (Buffer) เพื่อความมั่นคงทางอาหารและรักษาภูมิปัญญาของชาติเพื่อการผลิตอย่างยั่งยืน

จากการจัดเสวนาเกษตรกรต้นแบบก่อนสิ้นสุดโครงการ เมื่อวันที่ 18 กันยายน 2557 ณ เทศบาลตำบลบ่อไทย อำเภอหนองไผ่ จังหวัดเพชรบูรณ์ กับกลุ่มเกษตรกรในหัวข้อ “เกษตรกรได้อะไร...จากการผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เอง” เกษตรกรต้นแบบ 4 รายจากจังหวัดเพชรบูรณ์ นครสวรรค์ และตาก ให้ข้อมูลที่น่าสนใจโดยสรุปดังนี้

1) คุณธานินทร์ เครือขวัญ เกษตรกรต้นแบบจังหวัดเพชรบูรณ์ กล่าวถึงการร่วมโครงการตั้งแต่ปี 2553 มีผู้สนใจเพียง 3 รายเพราะคิดว่ายาก แต่ตนไม่ท้อถอยกลับเห็นว่าไม่ยากดังที่คิด ได้ใช้เมล็ดพันธุ์คุณภาพดี มั่นใจคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ในท้องตลาด และได้ถ่ายทอดประสบการณ์แก่เกษตรกรที่ สปก. จ.เพชรบูรณ์ พามาดูงาน 150 ราย และเกษตรกร จ.กำแพงเพชร สิ่งที่ได้รับจาก

โครงการคือ ความภาคภูมิใจที่เป็นเกษตรกรต้นแบบ ตนเองจบเพียงชั้น ป.4 แต่สามารถถ่ายทอดความรู้และแก้ปัญหาให้เพื่อนบ้านได้ ขณะนี้ได้รับใบอนุญาตเป็นผู้รวบรวมเมล็ดพันธุ์เพื่อจำหน่าย แล้ว จะใช้เครื่องหมายการค้า **ตรามะขาม**

2. คุณสุวรรณ นิ่มสวน เกษตรกรต้นแบบจังหวัดนครสวรรค์ ทดลองผลิตเมล็ดพันธุ์ใช้เองได้จึงในปีแรก 1 ไร่ มีทั้งผู้เห็นด้วยและไม่เห็นด้วย แต่ตนไม่ท้อได้เมล็ดพันธุ์นำไปปลูกต่อ 40-50 ไร่ ลดค่าเมล็ดพันธุ์ได้มาก ปัจจุบันเมล็ดพันธุ์ราคาสูงขึ้นแต่ต้นทุนของตนยังต่ำกว่าของเพื่อนบ้าน สิ่งที่ได้รับจากโครงการคือ สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ไว้ใช้เองและจำหน่าย และเป็นเกษตรกรต้นแบบถ่ายทอดความรู้ให้เพื่อนบ้าน และผู้ที่ ศวร.นครสวรรค์ พามาดูงานจาก ลาว กัมพูชา และภูฏาน เป็นความภาคภูมิใจอย่างหนึ่งของชีวิต

3. คุณสีมูล ติ๊บวงศ์ เกษตรกรต้นแบบจังหวัดตาก หลังจากพัฒนาเทคนิคการผลิต และได้คำแนะนำจากนักวิชาการเกษตร ทำให้ผลผลิตเมล็ดพันธุ์สูงขึ้นถึง 450 กิโลกรัมต่อไร่ เพื่อนบ้านสนใจมาเรียนรู้และทำตาม 17 ราย เมล็ดพันธุ์ปลูกแล้วให้ผลผลิตดีมีการสั่งจองซื้อเมล็ดพันธุ์ สิ่งที่ได้รับจากโครงการ คือ ได้ใช้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตเอง มั่นใจคุณภาพ ลดต้นทุนค่าเมล็ดพันธุ์ ขณะนี้รวมกลุ่มกัน 15 ราย จดทะเบียนเป็นวิสาหกิจชุมชนของบ้านแม่กาษาโพธิ์เงิน ผลิตเมล็ดพันธุ์จำหน่ายภายในกลุ่ม จะใช้เครื่องหมายการค้า **ตราน้ำพุ**

4. คุณสุกฤษฎิ์ ใจพรมเมือง เกษตรกรต้นแบบจังหวัดตาก มีสมาชิกสนใจ 7 ราย เรียนรู้วิธีการผลิตจากนักวิชาการเกษตร ตนทำแปลงผลิต 4 ไร่ แต่ประสบกับอากาศร้อนได้ผลผลิตรวม 180 กิโลกรัม นำเมล็ดพันธุ์ 75 กิโลกรัมปลูกต่อ และให้ญาติปลูก ที่เหลือ จำหน่าย 105 กิโลกรัมคิดแล้วยังได้กำไร ที่ตนปลูกต่อ 12 ไร่ได้ผลผลิตถึง 13 ตัน ทำให้เพื่อนบ้านสนใจปลูกและสั่งจองเมล็ดพันธุ์ สิ่งที่ได้รับจากโครงการ คือ ได้เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตเอง ได้ความรู้และประสบการณ์ในการปลูก ได้ความภาคภูมิใจในการเป็นผู้ให้ความรู้และอาชีพแก่เกษตรกรที่สนใจ

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณอธิบดีกรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร และเงินรายได้การดำเนินงานวิจัยด้านการเกษตร กรมวิชาการเกษตร ที่สนับสนุนงบประมาณดำเนินงาน ขอขอบพระคุณ ดร.บริบูรณ์ สมฤทธิ์ และ ดร.ธวัชชัย ณ นคร ที่กรุณาติดตามโครงการและให้ข้อเสนอแนะ ขอขอบพระคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ฯ และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร ฯ ในพื้นที่ที่ให้ข้อเสนอแนะ นักวิชาการเกษตรและเจ้าหน้าที่ที่ร่วมแรงร่วมใจดำเนินงานตลอดโครงการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรทุกท่านที่ร่วมกันสร้างความเข้มแข็งของกลุ่ม และช่วยกันผลักดันจนได้ผลสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ชุติมา คชวัฒน์ วิมลรัตน์ อินทร์แดน สาโรจน์ ตันกิจเจริญ สุรินทร์ สุขศิริ และพิเชษฐ์ กรุดลอยมา. 2550. การศึกษาอัตราแถวปลูกสายพันธุ์แท้พันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมดีเด่นทนทานแล้ง. หน้า 35-36. *ใน:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550. ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.

พิเชษฐ์ กรุดลอยมา สุริพัฒน์ ไทยเทศ กัลยา ภาพินธุ ชุติมา คชวัฒน์ ศิวิไล ลาภบรรจบ อมรา ไตรศิริ สาธิต อารีรักษ์ บุญเกื้อ ภูศรี อนันต์ สุวรรณรัตน์ และเทวา เมาลานนท์. 2552. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมทนทานแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3. หน้า 31-48.*ใน:* ผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2552. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Koshawatana C., Grudloyma, P., Traisiri, A., Jaipala, S., Watahanapansorn, S., Thiempeng, P., Saehue, S., Yang-Hee, C. and Park, K.J. 2013. Strengthening Seed Production through Maize Seed Village in Thailand: A Case Study. Korean J. Intl. Agri. 25 (1): 1-7.

Table 1 Number of farmers and officers who joined seminar in 2012-2014.

Item	Centers	No.	Date	Numbers			Numbers of Villages		
				Farmer	Officer	Total	Village	Sub-dist.	District
1	NSFCRC	1	28/11/55	92	10	102	18	9	4
		2	10/9/56	70	10	80	23	8	4
				162	**20**	**182**	**41**	**17**	**8**
2	PBFCRC	1	17/10/55	34	16	50	11	8	6
		2	10/4/56	14	12	26	7	3	2
				48	**28**	**76**	**18**	**11**	**8**
3	CMFCRC	1	31/10/55	35	10	45	5	3	1
		2	8/5/56	40	3	43	2	2	2
				75	**13**	**88**	**7**	**5**	**3**
4	TKARDC	1	25/10/55	19	9	28	5	2	2
		2	26/3/56	63	5	68	5	2	2
				82	**14**	**96**	**10**	**4**	**4**
5	STARDC	1	8/10/55	44	7	51	3	3	3
		2	16/8/56	28	2	30	4	4	3
				72	**9**	**81**	**7**	**7**	**6**
6	NSARDC	discuss	30/10/55	30	4	34	8	1	1
		discuss	28/8/56	36	7	43	12	6	1
				66	**11**	**77**	**20**	**7**	**2**
7	PBARDC	discuss	15/11/55	50	3	53	3	3	2
		1	12/9/56	68	6	74	1	1	1
				118	**9**	**127**	**4**	**4**	**3**
8	CMARDC	discuss	13/11/55	16	5	21	3	2	1
		1	27/5/56	60	10	70	1	1	1
				76	**15**	**91**	**4**	**3**	**2**
	Total	**13/3***		**14 – 92****	**3 – 16**	**26 - 102**	**1 - 23**	**4 - 17**	**2 - 8**

* Discussion among small groups of farmers

**Minimum-Maximum of farmers compared with each seminar in all areas.

Table 2 Numbers of model farmers and model areas in summer 2012/2013 and rainy season 2013.

No.	Name	Seed production model farm Area (rai) / Yield (kg/rai)		Varietal model farm Area (rai) / Yield (kg/rai)	
		Summer 2012/13	**Summer 2013/14**	**Summer 2012/13**	**Rainy season 2013**
1	Mr.Thanin Kruakwan (Petchabun)	9 (350)	14 (138)*	9 NS 3/CP 301 (1,365/1,302)	-
2	Mr.Songsilp Tursil (Petchabun)	-	5 (60)*		-
3	Mr.Seemool Tipwong (Tak)	7 (150)	4 (450)	10 นว.3/DK 191 (670/320)	-
4	Mr.Suwan Nimsuan (Nakhon Sawan)	1 (330)	4 (82)*	-	20 (NS 3) 836
5	Mr.Sawas Chwadit (Nakhon Sawan)	-	-	-	15 NS 3/CP 801 (1,275/1,700)
6	Mr.Pratep Mimtong (Sukhothai)	-	3 (70)**		15 NS 3/Pioneer 60 (734/569)
7	Mr.Serm Saengsuk (Sukhothai)	1 (500)	-		
8	Mr.Charoen Wongpa (Chiangmai)	1 (263)	-		
9	Mr.Charoon Boonpun (Chiangmai)	3 (200)	-		
	Total	22	30	19	50

* Exposed to cold weather at vegetative stage

** Exposed to high temperature at flowering

Table 3 General information on NS 3 hybrid maize seed production in 2013-2014 in 5 provinces.

Season	Duration	Number				Area	District
		Farmer	Village	Sub-district	District	(rai)	
1. Summer 2012/13	Oct. 2012 – May 2013	97	40	25	19	321.5	Tak Fa, Nongbua, Takli (NS) Wangpong, Muang, Nongpai, Seetep, Bungsampun, Lomsuk Lomkao (PB) Srisamrong, Bandanlanhoy (ST) Mae Sod (TK) Prao, Fang (CM)
2. Rainy Season 2013	June 2013 - Nov. 2013	10	2	2	2	37	Tak Fa (NS) Chiang Dao (CM)
3. Summer 2013/14	Nov. 2013 – June 2014	43	28	17	15	158.5	Tak Fa (NS) Seetep, Bungsampun, Muang, Chondan (PB) Mae Sod, Mae lamad (TK) Kireemas, Srisamrong, Bandanlanhoy (ST)
		10-97	**2-40**	**2-25**	**2-19**	**37-321.5**	

(NS) = Nakhon Sawan (PB) = Petchabun (CM) = Chiang Mai

(TK) = Tak (ST) = Sukhothai

Table 4 Yield, average yield, seed distribution, income and production cost of seed production.

Season	Yield (kg)	Yield Min - Max (kg/rai)	Self-use (kg)	Sale (kg)	Sale price (baht/kg)	Income (baht)	Production cost* (baht/rai)	Production cost* (baht/kg)
Summer 2012 (Nov.12-May13)	77,366	21-560	7,674	69,692	28-76	2,718,587	6,006	19-100
Rainy Season 2013 (June-Nov.13)	3,326	61-136	46	3,280	70	229,600	4,101	41-62
Summer 2013 (Nov.13-June 14)	16,750	15-450	5,086	12,369	50-75	848,290	7,992	43-94
Total	**97,342**	**15-560**	**12,806**	**85,341**	**28-76**	**3,796,477**	**4,101-7,992**	**19-100**

* Estimated cost from farmer interview

Table 5 Farmer satisfaction on hybrid seed production technique, NS 3 performance and yield.

Seed production[1/]	Satisfaction (%)					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**N**
1. Land preparation	0	8	8	30	54	0
2. Parent inbred ratio	0	7	12	28	53	0
3. Loguing	1	9	20	34	36	0
4. Detasselling	0	9	10	33	48	0
5. Male cutting	1	7	24	51	15	2
6. Harvesting	1	7	6	41	45	0
7. Seed yield	10	17	10	33	30	0
8. Seed quality	0	8	2	16	74	0
9. Save cost of seed purchase	0	9	5	15	67	4
NS 3 performance and yield[2/]	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**N**
1. Seedling vigor	7	4	12	34	43	0
2. Growth before flowering	6	5	10	36	43	0
3. Lodging	6	6	10	29	49	0
4. Leaf color	5	6	9	27	53	0
5. Drought tolerance	4	8	10	37	38	3
6. Seed price	7	9	9	17	55	3
7. Hand harvest	10	2	7	23	55	3
8. Yield per rai	2	12	19	32	34	1
9. Seed color	3	9	7	24	57	0
10. Overall satisfaction	1	6	19	33	41	0

1 = totally dissatisfied 2 = mostly dissatisfied 3 = Satisfied

4 = mostly satisfied 5 = totally satisfied N = No opinion

[1/]Data from 104 questionnaires from 5 provinces 3 seasons

[2/] Data from 205 questionnaires from 5 provinces 2 seasons

Table 6 Farmers satisfaction on DOA Services regarding the project Maize Seed Village "Nakhon Sawan 3".

Seed production	Satisfaction (%)					
	1	2	3	4	5	Average
1. Monitoring of technology transfer						**4.24**
1.1. Information/perception on project			4	70	26	4.22
1.2. Location approach			4	63	33	4.28
1.3. Production duration			9	67	24	4.15
1.4. Appropriate series of activity				71	29	4.29
2. Officer services/cooperator/lecturer						**4.44**
2.1. Knowledge of officers				52	48	4.48
2.2. Technology transfer methodology				52	48	4.48
2.3. Problem solution				35	65	4.35
2.4. Overall assessment			2	51	47	4.44
3. Facility						**4.46**
3.1. Booklet or seed manual available				59	41	4.41
3.2. Addition advice and comment at home				50	50	4.50
4. Service quality						**4.37**
4.1. Satisfaction on concept and new experiences			2	50	48	4.46
4.2. Satisfaction on implementation in production sites			4	61	35	4.30
4.3. Satisfaction on reduction of seed purchase		2	4	48	46	4.36
5. Overall satisfaction on the project			7	50	43	4.36
Average sum						4.37
%					87.44	

1 = Totally dissatisfied 2 = Dissatisfied 3 = mostly dissatisfied

4 = Satisfied 5 = Totally satisfied

Note : Questionnaires, interview and evaluation was performed by Satisfaction Assessment Committee of DOA.

ห้องปฏิบัติการเครือข่ายมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ในส่วนภูมิภาค เพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งและมั่นคงทางการเกษตรก้าวสู่ผู้นำ AEC

Regional Network Laboratory Accredited ISO/IEC 17025 : 2005 in Regional for Reinforcing the Strength and Agricultural Security toward AEC Leadership

ยสิศร์ อินทรสถิตย์[1/] วิทยา อภัย[2/] ศักดิ์สิทธิ์ จรรยากรณ์[3/] นาตยา จันทร์ส่อง[4/] จิราภา เมืองคล้าย[5/] เกษสิริ ฉันทพิริยะพูน[6/] อรพิน หนูทอง[7/] สรัญญา ช่วงพิมพ์[8/] อมรา หาญจวนิช[9/] วรรณรัตน์ ชุติบุตร[9/] ประภัสสรา พิมพ์พันธุ์[10/] นงพงา โอลเสน[2/] เนาวรัตน์ ตั้งมั่นคงวรกูล[2/] อาทิตยา พงษ์ชัยสิทธิ์[2/] สิริพร มะเจี่ยว[2/] เบญจมาศ ใจแก้ว[1/] สุธินี สาสีลัง[1/] พรศิริ สายะพันธ์[1/] วิภาพร เกียรตินิติประวัติ[1/] อรัญญา ลุนจันทา[3/] วัชราพร ศรีสว่างวงศ์[3/] ปริยานุช สายสุพรรณ์[3/] ณัฏฐ์ชยธร ขัตติยะพุฒิเมธ[3/] จารุพงศ์ ประสพสุข[3/] รัชดาวัลย์ อัมมินทร[4/] บังอร แสนคาน[4/] อิทธิพล บ้งพรม[4/] สุพัตรา รงฤทธิ์[4/] สุภาพร บ้งพรม[4/] มณฑาทิพย์ อรุณวรากรณ์[5/] กัญญารัตน์ เต็มปิยพล[5/] อาภรณ์ ทองบุราณ[5/] สมชาย ฉันทพิริยะพูน[6/] อุมาพร รักษาพราหมณ์[6/] ขนิษฐา วงษ์นิกร[6/] ประไพ หงษา[6/] ดาวนภา ช่องวารินทร์[6/] เฉลิมพล เอี่ยมพลับ[6/] สิริฉัตร เชาวน์วุฒิกุล[7/] นิกร โคตรสมบัติ[7/] จิตติลักษณ์ เหมะ[7/] อานนท์ สุขสวัสดิ์[8/] สาวิตรี เขมวงศ์[8/] พิรุณ ติระพัฒน์[8/] เยาวลักษณ์ แสงแก้ว[8/]

Yasit Intarasatit[1/] Wittaya Apai[2/] Saksit Chanyakorn[3/] Nattaya Jansong[4/] Chirapha Muangklai[5/] Kedsiri Chantapiriyapoon[6/] Orapin Nuthong[7/] Saranya Chongpim[8/] Omara Hanjavanich[9/] Wannarat Chutibut[9/] Prapassara Pimpan[10/] Nongpanga Olsen[2/] Naowarat Tangmunkongvorakul[2/] Atthitaya Pongchaisit[2/] Siriporn Majiew[2/] Benjamard Jaikaew[1/] Sutinee Saseelung[1/] Pornsiri Sayaphan[1/] Wipaporn Kiatnitiprawat[1/] Arunya Lunjanta[3/] Watcharaporn Srisawangwong[3/] Pariyanuch Saisuphan[3/] Natchayathon Khattiyaphutthimet[3/] Jarupong Prasopsuk[3/] Rachadawan Amminthorn[4/] Bongon Saenkhan[4/] Ittipon Bongprom[4/] Supattra rongrit[4/] Supaporn Bongprom[4/] Montatip Arunwarakorn[5/] Kanyarat Tempiyapon[5/] Arphorn Thongburan[5/] Somchai Chantapiriyapoon[6/] Umaporn Raksaparm[6/] Kanitta Wongnikorn[6/] Prapai Hongsa[6/] Daonapha Chongwarin[6/] Chalermpol Aiamplum[6/] Sirichat Chaowuttikul[7/] Nikorn Kotsombate[7/] Jittiluk Hama[7/] Anon Suksawas[8/] Sawitri Khemvong[8/] Pirun Tirapat[8/] Yaowalak Sangkaew[8/]

ABSTRACT

The Department of Agriculture Regional Network Laboratories (DOARNLs) was organized by the Laboratory Potential Development Committees under the control of the Office of Agricultural Research and Development (OARD) Region 1 - 8. There was an aim to develop them to get the laboratory accredited on comply with ISO/IEC 17025 : 2005, which established them to high standard quality

[1] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 (Office of Agricultural and Development Region 2)

[2] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 (Office of Agricultural and Development Region 1)

[3] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 (Office of Agricultural and Development Region 3)

[4] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 (Office of Agricultural and Development Region 4)

[5] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 (Office of Agricultural and Development Region 5)

[6] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 (Office of Agricultural and Development Region 6)

[7] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 (Office of Agricultural and Development Region 7)

[8] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 (Office of Agricultural and Development Region 8)

[9] กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร (Agriculture Production Sciences Research and Development Division)

[10] สำนักที่ปรึกษากรมวิชาการเกษตร (Office of the Cousellor)

at international level. The testing results provided the accuracy, precision, confidence and was reliable for the customers who practiced following the Fertilizer Act B.E. 2518 (1975), the Hazardous Substance Act B.E. 2535 (1992) and the Pest Quarantine Act B.E. 2507 (1964) which had one of the important missions of DOA to service Thai farmers' area throughout the country.

DOARNLs had shared and exchanged of the technical data, verification, collaborate testing and internal audit in order to join the works which were met to requirement of ISO/IEC 17025 : 2005. It was on this basis that we took them to accredit this system.

The results found that since OARD 1 - 8 were accredited with ISO/IEC 17025:2005, the farmers in regional office areas could get a better result to access more service at their site laboratories, thus the cost of journey to central office and time consume was decreased. The testing results had been believed and conducted to enforce with laws or improve the process of agricultural inputs. The testing results from 2012 to 2014 found that total 6,977 of fertilizers were analyzed and found that 1,218 samples (17.5%) were non-compliance. Active ingredient of 670 of pesticide products were analyzed the active ingredient and found that 26 samples (3.9%) were non- compliance. These non-compliance samples would be then determined by Law with the other involved offices. As a result, this helped the farmers get better qualities of fertilizer and pesticide products instead of non- compliance products which increased severe economic lost to the farmers in this country.

In addition, pesticide residues were analyzed in 36,087 plant samples were analyzed for pesticide residues. The objective was benefit for the farmers to improve better product quality and one of process for certified GAP systems. This increased safer product quality both Thai consumption and for exports. For example, fruits and vegetables were exported to Japan, EU, Singapore, and P.R. China had been observed higher content continuously, i.e. export vegetable was valued at 2,397 million bahts in 2014 increased to 11 and 24% as compared with those in 2012 and 2013 respectively. Lastly, fruit for export had value at 12,666 million bahts in 2014 increased to 6 and 5% as compared with those in 2012 and 2013 respectively.

In conclusion, it was found that farmers using fertilizer and other agricultural inputs with good quality, compliance product with certifying Q mark logo had been accepted from the market both inside and outside country. This increased strength and security of Thai farmer to produce safe product and being friendly with environment in order to get sustainable agricultural production system toward AEC leadership.

Key-words : Laboratory, ISO/IEC 17025 : 2005, Fertilizer, Toxic substance, Pesticide residue Farmer, Analysis, AEC

บทคัดย่อ

ห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิชาการเกษตร ดำเนินการโดยคณะทำงานพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 - 8 โดยมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาศักยภาพของห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคให้ได้รับการรับรองระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 เพื่อยกระดับมาตรฐานการวิเคราะห์ ของห้องปฏิบัติการทั้ง 8 เขต ให้มีมาตรฐานเดียวกัน และเทียบเท่าสากล ส่งผลให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ สร้างความเชื่อมั่นและเป็นที่เชื่อถือของผู้ใช้บริการ รองรับการดำเนินการตามพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ซึ่งเป็นภารกิจที่สำคัญของกรมวิชาการเกษตร ครอบคลุมการให้บริการเกษตรกรทั่วประเทศ

ห้องปฏิบัติการเครือข่ายมีการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางวิชาการ ทวนสอบผล เปรียบเทียบผลการทดสอบ (Collaborative Testing) ตลอดจนการตรวจติดตามคุณภาพภายในระหว่างห้องปฏิบัติการภายในเครือข่าย การดำเนินการดังกล่าวสอดคล้องตามข้อกำหนดมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 เป็นพื้นฐานสำคัญทำให้ห้องปฏิบัติการทั้ง 8 เขต ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005

ผลจากการที่ห้องปฏิบัติการในภูมิภาคทั้ง 8 เขต ได้รับการรับรองตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ส่งผลดีต่อเกษตรกรในส่วนภูมิภาค เกษตรกรสามารถเข้าถึงห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานสากลในพื้นที่ได้ ลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการเดินทางเข้ามายังส่วนกลาง ผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการมีความน่าเชื่อถือ สามารถนำไปใช้ประกอบการบังคับใช้ตามกฎหมาย หรือใช้ในการปรับปรุงระบบการผลิต จากผลการให้บริการตรวจวิเคราะห์ในปี พ.ศ. 2555 – 2557 พบว่าตัวอย่างปุ๋ยเคมี จำนวน 6,977 ตัวอย่าง เป็นปุ๋ยที่ไม่ได้มาตรฐาน จำนวน 1,218 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5 ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรดำเนินการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ 670 ตัวอย่าง เป็นผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ไม่ได้มาตรฐานจำนวน 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.9 ซึ่งปุ๋ยและผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้ จะถูกดำเนินการตามกฎหมายโดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้องป้องกันไม่ให้เกษตรกรใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ทั้งนี้หากเกษตรกรนำปัจจัยการผลิตที่ไม่ได้คุณภาพเหล่านี้ไปใช้จะก่อให้เกิดผลเสียหายอย่างใหญ่หลวงต่อระบบการเกษตร สิ่งแวดล้อม และเศรษฐกิจของประเทศอย่างมหาศาลจนไม่สามารถประเมินมูลค่าเป็นเงินได้

การดำเนินการด้านการตรวจสอบสารพิษตกค้าง จำนวน 36,087 ตัวอย่าง เป็นการให้บริการแก่เกษตรกรในการปรับปรุงคุณภาพผลผลิต และให้บริการประกอบการตรวจรับรองแปลงตามระบบ GAP การดำเนินการดังกล่าวทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพ มีความปลอดภัยเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ ซึ่งจะเห็นได้จากมูลค่าการส่งออก ผัก และผลไม้ไทยไปจำหน่ายยังประเทศญี่ปุ่น สหภาพยุโรป สิงคโปร์ และสาธารณรัฐประชาชนจีนมีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ยอดการส่งออกผักในปี พ.ศ. 2557 มูลค่าส่งออก 2,397 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจาก พ.ศ. 2555 และ 2556

ร้อยละ 11 และ 24 ตามลำดับ การส่งออกผลไม้ในปี พ.ศ. 2557 มีมูลค่าส่งออก 13,131 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจาก พ.ศ. 2555 และ 2556 ร้อยละ 6 และ 5 ตามลำดับ

จากผลการดำเนินการของห้องปฏิบัติการเครือข่ายกรมวิชาการเกษตรดังกล่าวส่งผลให้เกษตรกร ได้ใช้ปุ๋ยและปัจจัยการผลิตที่มีคุณภาพ ผลผลิตผ่านการตรวจสอบและรับรองความปลอดภัยผ่านตราสัญลักษณ์ Q เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ สร้างความเข้มแข็งและมั่นคงให้กับเกษตรกรไทยในการผลิตสินค้าปลอดภัย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดระบบการผลิตสินค้าเกษตรที่ยั่งยืนและสามารถก้าวสู่ผู้นำ AEC

คำหลัก : ห้องปฏิบัติการ ระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ มาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005
สารพิษตกค้าง ปุ๋ย วัตถุอันตรายทางการเกษตร การวิเคราะห์ เกษตรกร AEC

คำนำ

การให้บริการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมี ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร และสารพิษตกค้างในส่วนภูมิภาค ดำเนินการวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการ กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 ผู้ใช้บริการได้แก่ เกษตรกร ผู้ประกอบการ และหน่วยงานราชการในพื้นที่ ทั้งภายในและภายนอกกรมวิชาการเกษตร การให้บริการดังกล่าวรองรับพระราชบัญญัติที่สำคัญของกรมวิชาการเกษตร เช่น พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 และพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 ผลการวิเคราะห์จะถูกนำไปประกอบการบังคับคดีทางกฎหมาย ความถูกต้องแม่นยำของผลการวิเคราะห์ และความน่าเชื่อถือของห้องปฏิบัติการถือเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้นห้องปฏิบัติการที่ให้บริการดังกล่าวต้องมีมาตรฐานรองรับ เพื่อสร้างความน่าเชื่อถือในระดับสากล มาตรฐาน “ISO แสดงถึงความเท่าเทียมกันหรือมีระดับที่ใกล้เคียงกันของห้องปฏิบัติการ” มาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 (ISO : International Organization for Standardization, IEC : International Electrotechnical Commission) เป็นข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถของห้องปฏิบัติการทดสอบ และห้องปฏิบัติการสอบเทียบ จัดทำขึ้นโดยองค์การระหว่างประเทศว่าด้วยการมาตรฐาน และคณะกรรมาธิการระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรฐานสาขาอิเล็กทรอนิกส์ ใช้สำหรับให้ห้องปฏิบัติการทดสอบ/สอบเทียบ นำไปใช้ในการจัดทำมาตรฐานของห้องปฏิบัติการเพื่อการพัฒนาทั้งทางด้านบริหารและวิชาการ ดังนั้นการรับรองห้องปฏิบัติการ (Laboratory Accreditation) จึงเป็นการยอมรับความสามารถในกลุ่มประเทศสมาชิกระดับภูมิภาค (Asia Pacific Laboratory Accreditation Corporation) และระดับสากล (International Laboratory Accreditation Corporation) ของการดำเนินการทดสอบเฉพาะหรือชนิดของการทดสอบของห้องปฏิบัติการอย่างเป็นทางการ เพื่อให้มั่นใจได้ว่าในทุกขั้นตอนของห้องปฏิบัติการจะมีการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์และสามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ การตรวจติดตามการรักษาระบบคุณภาพจากหน่วยรับรองตามระยะเวลาที่กำหนด เพื่อให้มั่นใจว่าห้องปฏิบัติการยังคงรักษาประสิทธิภาพของระบบคุณภาพไว้ได้อย่างสม่ำเสมอ

การจัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ มาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ในส่วนภูมิภาคเริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ พ.ศ. 2545 การที่ห้องปฏิบัติการทั้ง 8 เขต จะได้รับการรับรองนั้นเป็นไปได้ยากหากขาดความช่วยเหลือและร่วมมือกัน ระหว่างห้องปฏิบัติการภายในกรมวิชาการเกษตร ดังนั้นห้องปฏิบัติการเครือข่ายในส่วนภูมิภาคจึงได้เกิดขึ้น โดยคณะทำงานพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการส่วนภูมิภาค สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 โดยมีห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กลุ่มงานพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพวัตถุมีพิษการเกษตร กลุ่มงานวิจัยสารพิษตกค้าง กลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร (กปผ.) เป็นที่ปรึกษา โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคทั้ง 8 เขต ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 เพื่อยกระดับมาตรฐานการให้บริการของห้องปฏิบัติการ กรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาคให้มีมาตรฐานเดียวกันและเทียบเท่าสากล ส่งผลให้ภารกิจในการกำกับดูแลตามพระราชบัญญัติที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบเกิดประสิทธิผล เกษตรกรได้ใช้ปุ๋ย วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีคุณภาพ ผลผลิตได้รับการตรวจสอบสารพิษตกค้าง สร้างความมั่นใจด้านความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค ทำให้สินค้าเกษตรไทยเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ สร้างความเข้มแข็งและมั่นคงด้านการเกษตรของประเทศไทย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการของกรมวิชาการเกษตรในส่วนภูมิภาคให้มีมาตรฐานเดียวกันและเทียบเท่าระดับสากล สร้างความเชื่อมั่นและน่าเชื่อถือให้กับผู้ใช้บริการ
2. พัฒนาห้องปฏิบัติการและบุคลากรในส่วนภูมิภาคอย่างต่อเนื่อง
3. เพิ่มศักยภาพในการให้บริการ ด้านการวิเคราะห์และทดสอบของกรมวิชาการเกษตรให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เกษตรกรสามารถเข้าถึงการให้บริการทั่วประเทศ
4. เพิ่มขีดความสามารถในการผลิตและส่งออกของเกษตรกร สร้างความเข้มแข็งและมั่นคงทางการเกษตรอย่างยั่งยืนและสามารถก้าวสู่ผู้นำ AEC

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. การวิเคราะห์ปุ๋ย

1.1 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด อ้างอิงตาม AOAC 955.04 (2005)

1.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด อ้างอิงตาม AOAC 958.01 (2005)

1.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ : Spectrophotometer

1.3 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโพแทสที่ละลายน้ำ อ้างอิงตาม OMAF 4.3.3 (1987)

1.3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ : Flame photometer และ Atomic absorption spectrophotometer (AAS)

2. การวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

2.1 วิธีวิเคราะห์อ้างอิงตาม Steinwandter H., Fresenius Z. Anal. Chem., 322 (1985) 752-754 ทำการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง 4 กลุ่ม ได้แก่ ออร์กาโนคลอรีน ออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมต และ ไพรีทรอยด์

2.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ : Gas chromatograph และ High performance liquid chromatograph

3. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

3.1 วิธีวิเคราะห์อ้างอิงตาม CIPAC Handbook ขึ้นกับชนิดของวัตถุอันตรายทางการเกษตร

3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ **:** Gas chromatograph (GC) และ High performance liquid chromatograph **(HPLC)**

วิธีการดำเนินการ

1. การพัฒนาห้องปฏิบัติการและการสร้างเครือข่าย

กรมวิชาการเกษตรจัดให้มีการพัฒนาห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาค เพื่อรองรับการให้บริการในพื้นที่ โดยดำเนินการอย่างเป็นระบบและต่อเนื่องมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 โดยในช่วงแรกดำเนินการผ่านโครงการพัฒนามาตรฐานและระบบตรวจสอบรับรองคุณภาพสินค้าเกษตร (SCQ) โครงการดังกล่าวจัดให้มีอาคารห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคทั้ง 8 เขต รวมทั้งครุภัณฑ์ที่จำเป็น เพื่อให้สามารถดำเนินการวิเคราะห์ด้านสารพิษตกค้างและปัจจัยการผลิตทางการเกษตรได้ จากนั้นจึงพัฒนาเพื่อเข้าสู่การรับรองระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ มาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 หลังจากที่ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคบางเขตได้รับการรับรองแล้ว จึงจัดให้มีห้องปฏิบัติการเครือข่ายขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนเรียนรู้ระหว่างกันภายในเครือข่าย ก่อให้เกิดการพัฒนาด้านมาตรฐานอย่างต่อเนื่อง มุ่งมั่นสู่การเป็นห้องปฏิบัติการคุณภาพตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 เป็นการยกระดับมาตรฐานห้องปฏิบัติการทั้ง 8 เขต ให้มีมาตรฐานเดียวกัน เทียบเท่าสากล ขั้นตอนการดำเนินงานดังแสดงในFigure 1

2. ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการทดสอบ

ทุกห้องปฏิบัติการของสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร มีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ในทุกวิธีการได้แก่ การวิเคราะห์ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสที่ละลายน้ำ การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ของวัตถุอันตรายทางการเกษตร และการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในผักและผลไม้ โดยการทดสอบค่าต่างๆ ตามมาตรฐานสากล เช่น Range, Linearity, Accuracy, Precision, Limit of Detection และ Limit of Quantitation เป็นต้น มีการดำเนินการทดสอบอย่างต่อเนื่องทุกปี พร้อมทั้งปรึกษาหารือ แลกเปลี่ยนความรู้ ประสบการณ์ ปรับปรุง และแก้ไขปัญหาด้านการวิเคราะห์ในที่ประชุมเครือข่ายห้องปฏิบัติการอย่างสม่ำเสมอ รวมถึงขั้นตอนและการเตรียมการขอรับรองห้องปฏิบัติการตามมาตรฐานสากล เพื่อการปรับปรุงคุณภาพมาตรฐานห้องปฏิบัติการให้เท่าเทียมกันและเป็นสากล เป็นที่ยอมรับในผลการวิเคราะห์เทียบเท่าห้องปฏิบัติการในส่วนกลางและทั่วโลก



Figure 1 Regional laboratory development of Department of Agriculture.

3. ระบบการตรวจติดตามและการประกันคุณภาพผลการทดสอบ

3.1 การตรวจติดตามคุณภาพภายในตามมาตรฐาน IS0/IEC 17025 : 2005

คณะทำงานพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 - 8 จัดให้มีการตรวจติดตามคุณภาพภายในของห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน IS0/IEC 17025 : 2005 ทั้งนี้จะใช้ผู้ตรวจประเมินจากห้องปฏิบัติการอื่นในเครือข่ายที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน หรือผู้ตรวจประเมินจากห้องปฏิบัติการที่มีความชำนาญเฉพาะ ดังนี้

3.1.1 ห้องปฏิบัติการในเครือข่ายที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน เช่น สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 กับ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3 กับ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4 สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กับ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6 สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7 กับ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8

3.1.2 การตรวจติดตามคุณภาพภายในด้านการวิเคราะห์ปุ๋ย ผู้ตรวจประเมินจากงานวิจัยระบบตรวจสอบคุณภาพปุ๋ย กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กลุ่มวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ร่วมกับผู้ตรวจประเมินจาก สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3, 6 และ 8 การวิเคราะห์สารพิษตกค้างผู้ตรวจประเมินจาก สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2, 5 และ 6

ทั้งนี้การดำเนินการดังกล่าว นอกจากจะเป็นการตรวจติดตามคุณภาพภายในตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 แล้วบุคลากรยังได้แลกเปลี่ยนเรียนรู้ระหว่างกันก่อให้เกิดการพัฒนา อย่างต่อเนื่องของห้องปฏิบัติการ

3.2 การจัดทำการเปรียบเทียบผลการทดสอบระหว่างห้องปฏิบัติการ (Collaborative Testing) ของคณะทำงานพัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาค เช่น การทดสอบความสามารถด้านการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และวัตถุอันตรายทางการเกษตร

3.3 การเข้าร่วมการทดสอบความชำนาญระหว่างห้องปฏิบัติการ (Proficiency Testing : PT) ด้านสารพิษตกค้างกับหน่วยงานระหว่างประเทศเช่น Food Analysis Performance Assessment Scheme (FAPAS) และ Nation Measurement Institute (NMI)

3.4 จัดทำ PT ด้านสารพิษตกค้าง และปุ๋ย ร่วมกับกองพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

4. รูปแบบการให้บริการของห้องปฏิบัติการเครือข่าย (ดังแสดงใน Figure 2)

4.1 สร้างมาตรฐานการให้การบริการของห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาค กรมวิชาการเกษตร ให้มีมาตรฐานเดียวกัน เทียบเท่าสากล

4.2 ปรับปรุงกระบวนการให้บริการ โดยมีเกษตรกร เป็นจุดศูนย์กลางของการให้บริการ ลดขั้นตอนและระยะเวลาในการให้บริการ

4.3 จัดให้มีการแลกเปลี่ยนข้อมูลทางวิชาการ บุคลากร ทวนสอบผลการทดสอบ และจัดให้มีการเปรียบเทียบผลการทดสอบ ตลอดจนตรวจติดตามคุณภาพภายในระหว่างห้องปฏิบัติการ ตามมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง แม่นยำ สร้างความเชื่อมั่นและน่าเชื่อถือให้กับผู้ใช้บริการ ผลการทดสอบสามารถนำไปใช้ประกอบการบังคับใช้กฎหมายและปรับปรุงกระบวนการผลิตได้อย่างมีประสิทธิผล

4.4 ในกรณีที่ตัวอย่างในแต่ละห้องปฏิบัติการมีปริมาณมากกว่าขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการที่รับได้ หรือ เกิดเหตุที่ทำให้ห้องปฏิบัติการไม่สามารถทำการทดสอบหรือให้บริการแก่ผู้ใช้บริการได้ เช่นเครื่องมือเสีย หรือ ชำรุด เป็นต้น ห้องปฏิบัติการเครือข่ายหาทางออกร่วมกัน การให้ยืมเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่จำเป็นกับการวิเคราะห์บางชนิด หรือการเดินทางไปใช้เครื่องมือในสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ใกล้เคียง เพื่อไม่ให้ผู้ใช้บริการได้รับผลกระทบหรือได้รับผลกระทบน้อยที่สุด ไม่มีนโยบายจ้างเหมาช่วงการทดสอบ (Subcontracting of tests) แต่ไม่มีผลเสียด้านมาตรฐานการวิเคราะห์ตามที่ได้รับการรับรอง

ระยะเวลาการดำเนินการ

1. การพัฒนาห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 ให้ได้การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 พ.ศ. 2555 – 2556
2. การสร้างห้องปฏิบัติการเครือข่าย พ.ศ. 2555 - 2557

สถานที่ดำเนินการ

1. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1
   สถานที่ตั้ง 80 ม. 12 ถนนเชียงใหม่ - พร้าว ต. หนองหาร อ. สันทราย จ. เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2
   สถานที่ตั้ง ต. วังทอง อ. วังทอง จ. พิษณุโลก

3. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3
   สถานที่ตั้ง ถ. มิตรภาพ ต. ศิลา อ. เมือง จ. ขอนแก่น
4. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 4
   สถานที่ตั้ง ถ. สถิตย์นิมานกาล (วารินชำราบ - พิบูลมังสาหาร) กม. 19 บ. คำนกเปล้า
   ต. ท่าช้าง อ. สว่างวีระวงศ์ จ. อุบลราชธานี
5. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5
   สถานที่ตั้ง ต. บางหลวง อ. สรรยา จ. ชัยนาท
6. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 6
   สถานที่ตั้ง ต. ตะปอน อ. ขลุง จ. จันทบุรี
7. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7
   สถานที่ตั้ง 126 ม. 4 ถ. สุราษฎร์ธานี - นครศรีธรรมราช (ทางหลวงสาย 401)
   ต. ท่าอุแท อ. กาญจนดิษฐ์ จ. สุราษฎร์ธานี
8. ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8
   สถานที่ตั้ง 9/116 ถ. กาญจนวณิช ม. 2 ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

จากการพัฒนามาตรฐานและการให้บริการของห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาค เพื่อยกระดับมาตรฐานการวิเคราะห์ ของห้องปฏิบัติการทั้ง 8 แห่ง ให้มีมาตรฐานเดียวกันและเทียบเท่าสากล เพื่อเพิ่มศักยภาพการให้บริการแก่เกษตรกร ผู้ประกอบการ และนักวิชาการในพื้นที่นั้น ผลการดำเนินการมีดังนี้

1. การพัฒนาห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้การรับรอง มาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005

ห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 มุ่งมั่นสู่การรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545 จนกระทั่งปี พ.ศ. 2552 ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1, 2 และ 6 ยื่นขอการรับรอง ด้านสารพิษตกค้างกับสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ (สมป.) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Department of Medical Science : DMSc) กระทรวงสาธารณสุข ได้รับการรับรอง ในปี พ.ศ. 2553 ในปี พ.ศ. 2554 สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 ได้รับการรับรองด้านสารพิษตกค้างจาก สมป. ในปี พ.ศ. 2555 ห้องปฏิบัติการ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 และ 3 ได้รับการรับรองด้านการวิเคราะห์ปุ๋ยจากสำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ (บร.) กรมวิทยาศาสตร์บริการ (Department of Science Service : DSS) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปัจจุบันห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคทั้ง 8 เขต ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 รายละเอียดการรับรองตาม Table 1 หน่วยงานที่ให้การรับรอง (Accreditation Body) 2 หน่วย ได้แก่ สำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ให้การรับรองการด้านการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร สำนักบริหารและรับรองห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ให้การรับรองด้านการวิเคราะห์ปุ๋ย การเลือกหน่วยรับรองของห้องปฏิบัติการขึ้นกับผลิตภัณฑ์หรือการทดสอบ ทั้งนี้ต้องสอดคล้องหรือตอบสนองกับความต้องการของผู้ใช้บริการในพื้นที่

1. การให้บริการด้านการวิเคราะห์ปุ๋ย

ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 ให้บริการวิเคราะห์ปุ๋ยเคมีแก่เกษตรกร ผู้ประกอบการและนักวิชาการ ในส่วนภูมิภาค ผู้ใช้บริการ จำนวน 2,438 ราย จำนวนตัวอย่าง 6,977 ตัวอย่าง เป็นปุ๋ยที่ไม่ได้มาตรฐาน จำนวน 1,218 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5 ปุ๋ยที่ไม่ได้มาตรฐานจะถูกส่งดำเนินคดีตามกฎหมาย โดยกลุ่มควบคุมตามพระราชบัญญัติ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1- 8 และสำนักนิติการ กรมวิชาการเกษตร

การดำเนินคดีหรือการบังคับใช้ตามกฎหมายของผู้กระทำผิด หลังจากที่ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 มีปริมาณเพิ่มขึ้น อย่างเห็นได้ชัด ส่งผลดีต่อเกษตรกรในการกำจัดปุ๋ยปลอมหรือปุ๋ยผิดมาตรฐานออกจากร้านค้า/แหล่งผลิตก่อนถึงมือเกษตรกร ทั้งนี้หากปุ๋ยที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้ตกถึงมือเกษตรกรจะก่อให้เกิดผลเสียหายใหญ่หลวงต่อระบบการเกษตร สิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจและสังคมของประเทศอย่างมหาศาลจนไม่สามารถคำนวณเป็นเงินได้

2. การให้บริการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์วัตถุอันตรายทางการเกษตรในส่วนภูมิภาค เป็นห้องปฏิบัติการที่จัดตั้งและพัฒนาเข้าสู่ระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ล่าสุด การจัดซื้อและติดตั้งครุภัณฑ์ดำเนินการใน ปี พ.ศ. 2554 – 2556 เริ่มเปิดให้บริการวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร ในปี พ.ศ. 2555 เป็นต้นมา พ.ศ. 2557 ห้องปฏิบัติการ 3 แห่ง ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 รายละเอียดตาม Table 1 ตัวอย่างที่ให้บริการมีเพียง 650 ตัวอย่าง จากผู้ใช้บริการ 305 ราย พบวัตถุอันตรายที่ไม่ได้มาตรฐาน 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 4.0 ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้ จะถูกส่งดำเนินคดีตามกฎหมายโดยกลุ่มควบคุมตามพระราชบัญญัติ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 – 8 และสำนักนิติการ กรมวิชาการเกษตร

3. การให้บริการวิเคราะห์สารพิษตกค้าง

การให้บริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืช เพื่อให้เกษตรกรนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ปรับปรุงกระบวนการผลิตพืชให้มีความปลอดภัย ตรงตามความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ ผลการวิเคราะห์ส่วนหนึ่งใช้ในการประกันคุณภาพความปลอดภัยของผลผลิตโดยผ่านตราสัญลักษณ์ Q จากการให้บริการตรวจวิเคราะห์สารพิษตกค้างของห้องปฏิบัติการทั้ง 8 แห่ง จำนวน 36,087 ตัวอย่าง ผู้ใช้บริการ 19,251 ราย ครอบคลุมการให้บริการทั่วประเทศ พบปริมาณสารพิษตกค้างในพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ซึ่งนำไปสู่การเฝ้าระวังการใช้วัตถุมีพิษทางการเกษตร

รายละเอียดตามTable 3 ดังนี้ พริกจากการวิเคราะห์ 2,116 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้างร้อยละ 35.30พบสารพิษตกค้างสูงกว่าปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit : MRL) ร้อยละ 5.67 เกณฑ์กำหนดใช้ค่า MRL ของประเทศไทย อ้างอิงตาม มกอช. 9002 - 2551 ในปี พ.ศ. 2555 - 2556 และ มกษ. 9002 - 2556 ในปี พ.ศ. 2557 เนื่องจากมีการปรับเปลี่ยนค่า MRL ของประเทศไทย นอกจากนี้ในกรณีผู้ที่ใช้บริการระบุประเทศผู้ส่งออก เกณฑ์การตัดสินจะใช้ค่า MRLของประเทศนั้นๆ จากการวิเคราะห์ทุเรียน 871 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้างร้อยละ 61.42 สารพิษตกค้างสูงกว่าค่า MRL ร้อยละ 1.26 ลำไยจากการวิเคราะห์ 836 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้างร้อยละ 71.17 สารพิษตกค้างสูงกว่าค่า MRL ร้อยละ 3.35 มะม่วงจากการวิเคราะห์ 2,568 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้างร้อยละ 24.61 สารพิษตกค้างสูงกว่าค่า MRL ร้อยละ 2.38 มังคุดจากการวิเคราะห์ 578 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้างร้อยละ 36.68 สารพิษตกค้างสูงกว่าค่า MRL ร้อยละ 5.19 ส้มโอจากการวิเคราะห์ 235 ตัวอย่าง พบสารพิษตกค้างร้อยละ 47.23 สารพิษตกค้างสูงกว่าค่า MRL ร้อยละ 3.8 ข้อมูลจากการวิเคราะห์สารพิษตกค้างใน Table 3 และ Table 4 สามารถนำมาใช้ในการเฝ้าระวังการใช้วัตถุมีพิษทางการเกษตรให้ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อให้เกิดระบบการควบคุมคุณภาพผลผลิตที่ดี สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ เป็นพื้นฐานนำไปสู่ความปลอดภัยทางอาหาร (Food safety) ลดต้นทุนการผลิต สร้างมูลค่าเพิ่มของสินค้า สร้างความเป็นอยู่ที่ดี สังคมเข้มแข็ง และสิ่งแวดล้อมที่ยั่งยืน

4. การสำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้บริการ

การสำรวจความพึงพอใจเป็นช่องทางหนึ่งในการติดต่อกับลูกค้า ข้อมูลที่ได้นำมาใช้ประโยชน์ในการจัดทำมาตรฐานการปฏิบัติงานและปรับปรุงคุณภาพการให้บริการ ให้สอดคล้องกับความต้องการของลูกค้า ผลการสำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้บริการ รายละเอียดตาม Table 2 ค่าเฉลี่ยร้อยละ 88.15 ความพึงพอใจต่อการให้บริการของแต่ละห้องปฏิบัติการร้อยละ 81.4 - 97.7 มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ร้อยละ 88.2

สรุปผลการดำเนินงาน

จากความร่วมมือของห้องปฏิบัติการเครือข่ายในส่วนภูมิภาค สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 ทำให้เกิดการพัฒนาของห้องปฏิบัติการและบุคลากรอย่างต่อเนื่อง ผลการดำเนินงานของห้องปฏิบัติการเครือข่ายโดยสรุปดังนี้

1. การพัฒนามาตรฐานการวิเคราะห์และการให้บริการสู่สากล ในปี พ.ศ. 2556 ทุกห้องปฏิบัติการได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 เป็นการยกระดับมาตรฐานของห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคของกรมวิชาการเกษตรให้มีมาตรฐานเดียวกัน เทียบเท่าสากล สามารถให้บริการทดสอบด้านปุ๋ย ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายทางการเกษตร และสารพิษตกค้าง ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สร้างความเชื่อมั่นและน่าเชื่อถือให้กับผู้ใช้บริการ สามารถลดข้อโต้แย้งและนำไปใช้ประกอบการบังคับคดีตาม

กฎหมาย เป็นเครื่องมือในการป้องปรามผู้กระทำผิดตาม พระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 หรือใช้ในการปรับปรุงระบบการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. การดำเนินคดีหรือการบังคับใช้ตามกฎหมายของผู้กระทำผิด หลังจากที่ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ปุ๋ยที่ไม่ได้มาตรฐาน จำนวน 1,218 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5 ซึ่งปุ๋ยที่ไม่ได้มาตรฐานเหล่านี้จะถูกส่งดำเนินคดีตามกฎหมายโดยกลุ่มควบคุมตามพระราชบัญญัติ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 และ สำนักนิติการ กรมวิชาการเกษตร ส่งผลดีต่อเกษตรกรในการกำจัดปุ๋ยปลอม หรือปุ๋ยผิดมาตรฐานออกจากร้านค้า/แหล่งผลิตก่อนถึงมือเกษตรกร

3. การให้บริการวิเคราะห์สารพิษตกค้างในพืช เพื่อให้เกษตรกรนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ปรับปรุงกระบวนการผลิตพืชให้มีความปลอดภัย นั้น พบว่าผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่มีความปลอดภัย จากTable 3 พืชที่พบปริมาณสารพิษตกค้างน้อยที่สุดคือมะม่วง พบสารพิษตกค้างเพียงร้อยละ 24.45 สารพิษตกค้างสูงกว่าค่า MRL เพียงร้อยละ 2.38 ทั้งนี้เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่ที่นำผลการวิเคราะห์ไปใช้ประโยชน์ เป็นกลุ่มปรับปรุงคุณภาพผลผลิตเพื่อส่งออกไปประเทศญี่ปุ่น ดังนั้นเกณฑ์การตัดสินจะใช้ค่า MRL ซึ่งมีความเข้มงวดสูง

4. ผลสำรวจความพึงพอใจของผู้ใช้บริการ พบว่าผู้ใช้บริการส่วนใหญ่พึงพอใจในการให้บริการของห้องปฏิบัติการเครือข่าย ทั้งนี้เนื่องจากเจ้าหน้าที่ให้บริการด้วยความเป็นกลาง ไม่เลือกปฏิบัติ ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความแม่นยำ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ลดข้อโต้แย้ง ก่อให้เกิดความเป็นธรรมแก่เกษตรกร ซึ่งผลการสำรวจความพึงพอใจนี้จะถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงกระบวนการทำงานของห้องปฏิบัติการให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ปุ๋ย วัตถุอันตราย และสารพิษตกค้าง ในส่วนภูมิภาค สวพ. 1 - 8 ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 มีมาตรฐานด้านการวิเคราะห์และการให้บริการในระดับเดียวกันทั่วประเทศ เทียบเท่าสากล สร้างความเชื่อมั่นและน่าเชื่อถือให้กับผู้ใช้บริการ ผลการวิเคราะห์ลดข้อโต้แย้ง สามารถนำไปใช้ประกอบการบังคับคดีได้ตามกฎหมาย เป็นเครื่องมือในการป้องปรามผู้กระทำผิดตราพระราชบัญญัติปุ๋ย พ.ศ. 2518 พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 หรือใช้ในการปรับปรุงระบบการผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. เพิ่มช่องทางการให้บริการด้านการทดสอบปุ๋ย วัตถุอันตราย และสารพิษตกค้างของกรมวิชาการเกษตร ผู้รับบริการสามารถเข้าถึง ห้องปฏิบัติการมาตรฐาน ISO/IEC 17025 : 2005 ได้ง่ายไม่ต้องเดินทางเข้ามาใช้บริการในส่วนกลาง เพิ่มความสะดวกและลดค่าใช้จ่ายของเกษตรกรและผู้ใช้บริการ

3. เกษตรกรได้ใช้ปัจจัยการผลิต ปุ๋ย วัตถุอันตรายทางการเกษตรที่มีคุณภาพ ปุ๋ยและผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ไม่ได้มาตรฐาน จะถูกดำเนินคดีตามกฎหมายโดยหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ป้องกันไม่ให้เกษตรกรใช้ปัจจัยการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ทั้งนี้หากเกษตรกรนำปัจจัยการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานไปใช้ จะก่อให้เกิดผลเสียหายต่อระบบการเกษตร สิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจและสังคมของประเทศอย่างมหาศาล จนไม่สามารถประเมินมูลค่าเป็นเงินได้

4. การรวบรวมข้อมูลด้านสารพิษตกค้าง จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 สามารถจัดทำฐานข้อมูลด้านสารพิษตกค้างจากการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตร เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังการใช้สารเคมี การติดตามการระบาดของศัตรูพืชเป็นพื้นฐานสำคัญนำไปสู่ความปลอดภัยทางอาหาร (Food safety) และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

5. เพิ่มศักยภาพและขีดความสามารถในการแข่งขัน ด้านการผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรปลอดภัย มีการประกันคุณภาพสินค้าผ่านตราสัญลักษณ์ Q สินค้าเกษตรได้รับการยอมรับทั้งภายในและต่างประเทศ ซึ่งจะเห็นได้จากมูลค่าการส่งออก ผัก และผลไม้ไทยไปจำหน่ายยังประเทศญี่ปุ่น สหภาพยุโรป สิงคโปร์ และสาธารณรัฐประชาชนจีนมีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การส่งออกผักในปี พ.ศ. 2557 มีมูลค่าส่งออก 2,397 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจาก พ.ศ. 2555 และ 2556 ร้อยละ 11 และ 24 ตามลำดับ การส่งออกผลไม้ในปี พ.ศ. 2557 มูลค่าส่งออก 13,131 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจาก พ.ศ. 2555 และ 2556 ร้อยละ 6 และ 5 ตามลำดับ เป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิต ขีดความสามารถในการแข่งขัน เสริมสร้างความเข้มแข็ง และมั่นคงทางการเกษตร พร้อมก้าวเป็นผู้นำด้านผลิตสินค้าเกษตรปลอดภัยมีคุณภาพระดับ AEC

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการพัฒนามาตรฐานห้องปฏิบัติการในส่วนภูมิภาคทุกท่าน ทั้งท่านอธิบดี รองอธิบดี ผู้บริหารกรมวิชาการเกษตรทุกท่าน บุคลากรจากกลุ่มวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตร กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ทุกท่าน ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 - 8 ทั้งอดีตและปัจจุบัน ขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับ อดีตผู้เชี่ยวชาญ จันทร์ทิพย์ ธำรงศรีสกุล, นลินี จาริกภากร และ จริยา ประศาสน์ศรีสุภาพ นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้อำนวยการกลุ่มวิจัยเกษตรเคมี นางอมรา หาญจวนิช และผู้เกี่ยวข้อง ที่มีส่วนสำคัญในการพัฒนาห้องปฏิบัติการปุ๋ยจนได้รับการรับรองเป็นส่วนใหญ่

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์บริการข้อมูลเศรษฐกิจการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2558. การส่งออกผัก และผลไม้, 25 มีนาคม 2558 http:// www.oae.go.th

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหาร มกอช. 9002-2551 สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 46 หน้า.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 9002-2556 สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 50 หน้า.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม, 2548 ข้อกำหนดทั่วไปว่าด้วยความสามารถห้องปฏิบัติการทดสอบและสอบเทียบ มอก. 17025-2548, 32 หน้า

Horwitz, W. and Latimer, G.E.(eds.). 2005. Official Method of Analysis of AOAC International. 18th Ed. Official Method 957.02, 958.01 AOAC International Inc., Gaithersberg, MD.

Steinwandter H., 1985 Universal 5 min on – line Method for Extracting and Isolating Pesticide Residues and Industrials. Fresenius Z. Anal. Chem., 322 752-754

The National Institute of Agro-Environmental Science., Ministry of Agricultural, Forestry, and Fisheries, Japan 1987 OMAF, Official Methods of Analysis of Fertilizer,

Table 1 Year (A.C.) of accredited ISO/IEC 17025 : 2005 for laboratory OARD 1 - 8.

Laboratory	Pesticide residue analysis Lab.	Fertilizer analysis Lab.	Toxic substance analysis Lab.	Accreditation Body*
OARD 1	2010	2012	2014	DMSc and DSS
OARD 2	2010	-	-	DMSc
OARD 3	-	2012	-	DSS
OARD 4	2012	2012	2014	DMSc and DSS
OARD 5	2011	2014	-	DMSc
OARD 6	2010	2014	2014	DMSc
OARD 7	-	2013	-	DSS
OARD 8	-	2013	-	DSS

***DMSc :** Department of Medical Science **DSS :** Department of Science Service

Table 2 Number of client, number of sample analysis and satisfaction of client for each laboratory Office of Agricultural Research and Development Region (OARD) 1-8 (2512 - 2514)

Laboratory	Fertilizer analysis			Toxic substance analysis			Pesticide residue analysis		Satisfaction of client (%)
	Client	Sample	Non-standard	Client	Sample	Non-standard	Client	Sample	
OARD 1	452	1,049	75	20	150	4	2,380	4,654	88.4
OARD 2	138	483	181	0	0	0	1,432	5,945	86.0
OARD 3	114	761	73	4	11	0	3,015	3,730	84.0
OARD 4	151	591	161	15	65	15	3,016	3,236	97.7
OARD 5	618	1,052	190	194	244	5	2,176	3,427	83.0
OARD 6	650	1,050	198	67	150	2	3,670	7,850	81.4
OARD 7	273	1,378	172	1	18	0	2,366	3,381	88.0
OARD 8	42	613	168	4	12	0	1,196	3,864	96.7
Total	2,438	6,977	1,218	305	650	26	19,251	36,087	88.2

Table 3 Pesticide residues founded in economic crops from the origin.

Plant	Pesticide residue found.	Pesticide residue founded from the origin.								
		Upper North	Lower North	Upper Northeast	Lower Northeast	Central	East	Upper South	Lower South	Total
Chili	Sample analyze (No.)	-	548	578	911	-	-	-	79	2,116
	Pesticide detection (%)	-	31.93	39.79	36.44	-	-	-	12.66	35.30
	> MRL* (%.)		1.46	3.81	9.88				0	5.67
Durain	Sample analyze (No.)	-	-	-	-	-	621	250	-	871
	Pesticide detection (%)	-	-	-	-	-	76.17	24.80	-	61.42
	> MRL (%.)						1.45	0.8		1.26
Longan	Sample analyze (No.)	249	423	-	-	-	164	-	-	836
	Pesticide detection (%)	84.74	55.56	-	-	-	90.85	-	-	71.17
	> MRL (%.)	0.80	2.60	-	-	-	9.15	-	-	3.35
Mango	Sample analyze (No.)	36	856	490	93	205	789	99	-	2,568
	Pesticide detection (%)	38.89	25.82	27.76	7.53	26.34	20.79	36.36	-	24.61
	> MRL (%.)	2.78	1.64	1.22	2.15	0.49	4.69	0	-	2.38
Mangosteen	Sample analyze (No.)	-	-	-	-	-	356	222	-	578
	Pesticide detection (%)	-	-	-	-	-	57.02	4.05	-	36.68
	> MRL (%.)						8.43	0		5.19
Pomelo	Sample analyze (No.)	-	152	-	-	32	-	51	-	235
	Pesticide detection (%)	-	57.24	-	-	31.25	-	47.06	-	47.23
	> MRL (%.)	-	5.92	-	-	0	-	0	-	3.8

* MRL: Maximum Residue Limit

Table 4 The qualitative and quantitative of pesticide residues founded in mango from the origin.

Plant	Pesticide list	Range of pesticide detection (mg/kg)						
		Upper North	**Lower North**	**Upper Northeast**	**Lower Northeast**	**Central**	**East**	**Upper South**
Mango	alpha-endosulfan	ND	0.01-0.02	ND	ND	ND	ND	ND
	beta-endosulfan	ND	0.01-0.02	ND	ND	ND	ND	ND
	endosulfan-sulfate	ND	0.05-0.27	ND	ND	ND	ND	ND
	Carbaryl	ND	ND	0.01-0.13	ND	ND	ND	ND
	Chlorpyrifos	0.01-0.03	<0.01-1.01	0.01-0.54	ND	0.01-0.14	0.01-0.13	0.01-0.33
	Cypermethrin	0.01-0.67	<0.01-1.02	0.01-0.1	0.01-0.05	0.08-0.14	0.01-1.22	0.01-0.17
	Deltamethrin	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND
	Diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01-0.90
	Dimethoate	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND
	EPN	0.04-0.16	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Ethion	0.01-0.03	0.09	ND	ND	ND	0.04-3.80	0.10-0.50
	Fenvalerate	ND	ND	ND	ND	0.06-0.25	0.01-0.36	ND
	Lambda-cyhalothrin	<0.01-0.05	<0.01-1.02	ND	0.01	0.06	0.02	ND
	Malathion	ND	ND	ND	ND	ND	0.01-0.04	ND
	Methomyl	ND	ND	0.02-0.14	ND	ND	ND	ND
	Omethoate	ND	ND	ND	ND	ND	0.02-0.82	ND
	Oxamyl	ND	ND	0.15	ND	ND	ND	ND
	Permethrin	ND	0.02	ND	ND	ND	ND	ND
	Phosphamidon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1
	pirimiphos-methyl	ND	0.01-0.03	0.01-0.02	ND	ND	0.01-0.08	ND
	pirimiphos-ethyl	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.07
	Profenofos	ND	<0.01-0.02	0.01	ND	ND	0.15	ND
	Prothiofos	ND	<0.01	ND	ND	ND	ND	0.01
	Triazophos	0.01-0.02	ND	ND	ND	ND	0.06	ND



Figure 2 Diagram of laboratory ISO/IEC 17025 : 2005 network for services in the region



Figure 3 and 4 Pesticide residue analysis laboratory



Figure 5 and 6 Fertilizers analysis laboratory



Figure 7 In house training by OARD 5



Figure 8 Analyzes fertilizer by atomic absorption spectrophotometer













Figure 9 – 14 : Office of Agricultural Research and Development Region 1 – 8 accredited on ISO/IEC 17025 : 2005 from Department of Medical Science and Department of Science Service

มาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ

The Special Control Scheme for the Export of Fresh Fruits and Vegetables to the European Union, Norway, and Switzerland, "Establishment List: EL"

เสริมสุข สลักเพ็ชร์ กุลวิไล สุทธิลักษณวนิช[1/] ปรียานุช ทิพยะวัฒน์[1/]
เกรียงไกร สุภโตษะ[1/] อัจฉรีย์ เตโชพาร[1/] ทรรศน์สรัล รัตนทัศนีย[1/]
รุ่งทิวา รอดจันทร์[1/] งามจิตร ดวงดี[1] สุระเดช ขจรไชยพฤกษ์[1/]
ชวนา กำเนิดบุญ[1/] ศจีรัตน์ กางกั้น[1/] กรรณิการ์ เพ็งคุ้ม[2/]
กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1-8
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

Surmsuk Salakpetch Kulwilai Suthilucksanavanish[1/] Preeyanooch Tippayawat[1/]
Kriangkai Supatosa[1/] Ajcharee Taechoran[1/] Tasrun Ratanathusnee[1/]
Roongtiwa Rodchan[1/] Ngamjit Duangdee Suradech Khajornchaiyaphruk,
Chawana Kamneardboon Sageerat Kangkunt[1/] Kannikar Phengkum[2/]
Plant Standard and Certification Office, Office of Agricultural Regulation,
Plant Protection Research and Development Office,
Office of Agricultural Research and Development region 1-8,
Post – Harvest and Productions Processing Research and Development Office

ABSTRACT

The special control scheme for the export of fresh fruits and vegetables to the European Union, Norway, and Switzerland, so called the "Establishment List" (EL) was developed and implemented by the Department of Agriculture in order to solve the problem on continuous pest interceptions on 5 groups of 16 vegetables exported to the European Union. The scheme was designed as a control system for both sanitary and phytosanitary aspects and implemented by both government and private sector since 14 March 2011. The scope was later extended for additional 6 vegetables in 2012 to cover commodities often detected with pests prior to export and those with pesticide residues and microbiological contamination problems under the EU regulation 669/2009

[1] กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช
Plant Standard and Certification Division

[2] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
Post-Harvest and Processing Research and Development Division

on the increased level of official control on imported food of non animal origin. In total there are 22 vegetables under the scheme having further objective to delist Thai vegetables from the mentioned EU regulation. The Department laid down criteria, procedure, and conditions for the control of production chain from farms to packing houses. In addition to GAP certification requirement, pest management and agricultural chemicals uses in compliance with EU regulations, as well as contracted farming, are required. Packing houses shall be GMP certified with HACCP principles implementation and traceability system. Private sector is responsible for the implementation and production control according to the criteria and conditions. On site audits for verification shall be conducted before the approval of packing houses and farms, as well as the follow up audits whenever notifications received. Capacity building training courses on quarantine pests identification have been provided to packing houses since 2012.

Cooperation and integration of work from various agencies have made the successful achievement of the scheme in terms of problem management and trade facilitation. In 2011, there were 11 establishments under the scheme while, at present, there are 27 establishments. Significant reduction of pest interceptions has been observed. Moreover, the European Union has decreased level of control for certain Thai vegetables on pesticides residues and microbial contamination under the regulation 669/2009. Since the scheme was established, Brassica vegetables, such as, kale and Chinese cabbage were removed, while others, namely yard long bean, eggplant, holy basil, sweet basil, mint, coriander were reduced official control rate. Recently, holy basil, sweet basil, mint, and coriander are removed from both pesticide residues and microbiological contamination control after the recent review by the EU which will take effect from 1 January 2015.

Key-words: Establishment List, GAP, GMP, HACCP, pests, sanitary and phytosanitary measures

บทคัดย่อ

มาตรการควบคุมพิเศษ EL เป็นมาตรการที่กรมวิชาการเกษตรออกแบบและดำเนินการ เพื่อแก้ไขปัญหาการแจ้งเตือนตรวจพบศัตรูพืชในสินค้าพืชผัก 5 กลุ่ม 16 ชนิด จากสหภาพยุโรปอย่างต่อเนื่อง มาตรการควบคุมพิเศษ EL เป็นระบบควบคุม กำกับ ดูแลทั้งทางด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช และดำเนินการร่วมกันทั้งภาครัฐและเอกชน โดยเริ่มดำเนินการตั้งแต่วันที่ 14 มีนาคม 2554 ต่อมาในปี 2555 มีการขยายรายการพืชผักอีก 6 ชนิด เพื่อให้ครอบคลุมชนิดพืชที่พบปัญหาสารตกค้างและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ภายใต้กฎระเบียบสหภาพยุโรปว่าด้วยการเพิ่มระดับการควบคุม

สินค้านำเข้าที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชของสหภาพยุโรป (Regulation 669/2009) และพืชที่ตรวจพบศัตรูพืชก่อนการส่งออก รวมเป็นพืชผัก 22 ชนิด โดยมีวัตถุประสงค์เพิ่มเติมให้สหภาพยุโรปยกเลิกรายการพืชผักของประเทศไทยออกจากกฎระเบียบดังกล่าว มาตรการควบคุมพิเศษ EL เป็นระบบควบคุมตลอดสายการผลิตตั้งแต่แปลงเกษตรกรจนถึงโรงคัดบรรจุ โดยแปลงเกษตรกรต้องได้รับการรับรอง GAP สำหรับพืชประกอบกับการจัดการศัตรูพืชและการใช้สารเคมีสอดคล้องกับข้อกำหนดของสหภาพยุโรป และเกษตรกรเป็นเครือข่ายกับโรงคัดบรรจุ สำหรับโรงคัดบรรจุต้องได้รับการรับรอง GMP และมีการนำหลักการของระบบ HACCP ไปประยุกต์ใช้ รวมถึงมีการจัดทำระบบตามสอบสินค้า โดยกรมวิชาการเกษตรมีการตรวจประเมินทวนสอบระบบการควบคุมเพื่อขึ้นทะเบียนบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุตามมาตรการควบคุมพิเศษฯ รวมถึงการตรวจติดตามผลการดำเนินการกรณีมีการตรวจพบปัญหา และเพื่อเพิ่มองค์ความรู้ให้แก่โรงคัดบรรจุกรมวิชาการเกษตรได้จัดหลักสูตรการจำแนกศัตรูพืชกักกันที่พบในผักผลไม้สดส่งออกไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิสอย่างต่อเนื่องทุกปี ตั้งแต่ปี 2555 ถึงปัจจุบัน

มาตรการควบคุมพิเศษ EL เป็นการบูรณาการความร่วมมือของหลายหน่วยงานในการดำเนินการให้บรรลุวัตถุประสงค์และมีการพัฒนางานอย่างต่อเนื่องเพื่อแก้ไขปัญหาและสนับสนุนการส่งออก ผลการดำเนินงานประสบความสำเร็จเป็นลำดับ ในปี 2554 มีโรงคัดบรรจุที่ได้รับการขึ้นทะเบียน จำนวน 11 โรง ปัจจุบันมีโรงคัดบรรจุที่ได้รับการขึ้นทะเบียน จำนวน 27 โรง สามารถลดสถิติการตรวจพบศัตรูพืชในพืชผักภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้สหภาพยุโรปได้ยกเลิกรายการตรวจสอบและลดอัตราการสุ่มตรวจสอบสารตกค้างและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์พืชผักของประเทศไทยตาม Regulation 669/2009 โดยยกเลิกรายการพืชคะน้าและกวางตุ้ง และปรับลดอัตราการสุ่มตรวจสอบพืชถั่วฝักยาว มะเขือ กะเพรา โหระพา สะระแหน่ ผักชีไทย และสหภาพยุโรปได้แจ้งผลการพิจารณายกเลิกรายการตรวจสอบสารตกค้างและเชื้อจุลินทรีย์ในพืชกะเพรา โหระพา สะระแหน่ และผักชีไทย มีผลตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2558

คำหลัก : มาตรการควบคุมพิเศษ EL, มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช, หลักปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) สำหรับพืช, หลักปฏิบัติที่ดีในการผลิตสินค้าเกษตรด้านพืช (GMP), หลักการของระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (HACCP), ศัตรูพืช

คำนำ

มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชเป็นมาตรการที่ประเทศต่างๆ นำมาใช้เพื่อปกป้องสุขภาพมนุษย์ สัตว์และพืชจากอันตรายที่อาจเกิดจากสินค้านำเข้า การตรวจสอบสินค้านำเข้าเป็นระบบการควบคุมเพื่อให้มั่นใจว่าสินค้าเป็นไปตามมาตรฐานที่กำหนด ประเทศไทยมีการส่งออกสินค้าพืชผักผลไม้ไปทั่วโลก โดยตลาดที่มีการส่งออกมากรวมถึงสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ซึ่งมีความเข้มงวดเรื่องการกำหนดมาตรฐาน จากเหตุการณ์ตรวจพบการปนเปื้อน

เชื้อจุลินทรีย์ในพืชผักส่งออกจากไทยไปนอร์เวย์ เมื่อปี 2548 เป็นสาเหตุการระงับการนำเข้าชั่วคราว ส่งผลให้มีการนำมาตรฐานการผลิต GAP และ GMP มาเป็นข้อกำหนดสำหรับการส่งออกพืชผักบางชนิดที่มีความเสี่ยง และต่อมาได้มีประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2552 และที่แก้ไขเพิ่มเติม

จากสถานการณ์ที่ผ่านมาสหภาพยุโรปได้ส่งคณะผู้ตรวจประเมินจาก Food and Veterinary Office (FVO) มาตรวจประเมินระบบควบคุมตรวจสอบรับรองด้านสุขอนามัยพืชอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี 2549 ซึ่งผลการตรวจประเมินยังพบข้อบกพร่อง ประกอบกับการแจ้งเตือนการตรวจพบศัตรูพืชกักกัน ได้แก่ เมลงวันหนอนชอนใบ (*Liriomyza sativae* Blanchard) แมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci* (Genn.)) แมลงวันผลไม้ (*Tephritidae*) และเพลี้ยไฟฝ้าย (*Thrips palmi* Karny) ในผักผลไม้จากไทยอย่างต่อเนื่อง โดยตรวจพบมากที่สุดในปี 2552 รวม 716 ครั้ง และในครึ่งแรกของปี 2553 ตรวจพบศัตรูพืชกักกัน รวม 363 ครั้ง ส่งผลให้สหภาพยุโรปกำหนดมาตรการเข้มงวดกับสินค้าพืช 5 กลุ่ม 16 ชนิดของไทย โดยให้มีการตรวจพบปัญหาศัตรูพืชกักกันได้ไม่เกิน 5 ครั้ง ภายในระยะเวลา 1 ปี หากตรวจพบเกินกว่าที่กำหนด สหภาพยุโรปจะดำเนินมาตรการห้ามนำเข้าสินค้ากลุ่มดังกล่าว ซึ่งมีทั้งที่เป็นพืชควบคุม (Regulated plants) ของสหภาพยุโรป ได้แก่ *Ocimum* spp. (กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า) *Momordica charantia* (มะระจีน มะระขี้นก) *Solanum melongena* (มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น) และที่ไม่เป็นพืชควบคุม ได้แก่ *Capsicum* spp. (พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู) และ *Eryngium foetidum* (ผักชีฝรั่ง) แต่มีการแจ้งเตือนตรวจพบศัตรูพืชกักกัน ตามกฎระเบียบสุขอนามัยพืชของสหภาพยุโรป ฉบับที่ 29 ปี ค.ศ. 2000 (Directive 2000/29/EC) ซึ่งได้กำหนดชนิดศัตรูพืชกักกัน ชนิดพืชควบคุม รายละเอียดเงื่อนไขรับรองพิเศษสำหรับพืชผักผลไม้และเมล็ดพันธุ์ การส่งออกสินค้าพืชดังกล่าว ต้องเป็นไปตามกฎระเบียบอย่างเข้มงวด เพื่อป้องกันผลกระทบจากมาตรการของสหภาพยุโรปและเป็นการยกระดับการผลิต ซึ่งทำให้เกิดความเชื่อมั่นในสินค้าจากประเทศไทย เพิ่มเติมจากเดิมซึ่งได้เคยมีกำหนดรายการพืชควบคุมเฉพาะตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรมวิชาการเกษตรซึ่งเป็นหน่วยงานกำกับดูแลการออกใบรับรองสุขอนามัย และสุขอนามัยพืชสำหรับผักผลไม้สดส่งออกไปต่างประเทศ รวมถึงเป็นองค์กรอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) จึงได้พัฒนาระบบการควบคุมและกำหนดมาตรการควบคุมการผลิตเพื่อการส่งออกพืช 5 กลุ่ม 16 ชนิด โดยออกประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่อง การออกใบรับรองสุขอนามัยพืชและใบรับรองสุขอนามัยสำหรับสินค้าพืชผักสดไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส โดยการขอใบรับรองดังกล่าว ต้องปฏิบัติตามแนบท้ายประกาศกรมวิชาการเกษตรที่กำหนด มาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ (Establishment List: EL) หรือเรียกสั้นๆ ว่า “มาตรการควบคุมพิเศษ EL” เริ่มดำเนินการเมื่อวันที่ 14 มีนาคม 2554 ซึ่งเป็นการเห็นชอบร่วมกันระหว่างกรมวิชาการเกษตรและผู้ประกอบการผลิตและส่งออกผักผลไม้ไป

สหภาพยุโรป หลังจากการดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL มาเป็นระยะเวลาหนึ่ง กรมวิชาการเกษตรเห็นว่า มาตรการควบคุมพิเศษ EL ไม่เพียงแต่จะแก้ไขปัญหาด้านสุขอนามัยพืชเท่านั้น แต่เป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาความปลอดภัยด้านสารเคมีตกค้าง และเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดได้อย่างยั่งยืน กรมวิชาการเกษตรจึงได้ขยายขอบข่ายชนิดพืชที่มีการตรวจพบสารเคมีตกค้าง และเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสหภาพยุโรปได้กำหนดมาตรการเข้มงวดกับสินค้านำเข้าจากไทยตั้งแต่ปี 2552 ด้วยการเพิ่มระดับการควบคุมสินค้านำเข้าที่มีแหล่งกำเนิดจากพืชของสหภาพยุโรป (Regulation 669/2009) อีก 5 ชนิด ได้แก่ ถั่วฝักยาว คะน้า กวางตุ้ง ผักชีไทย และสะระแหน่ นอกจากนี้ได้กำหนดให้ขึ้นฉ่ายเป็นพืชภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL ด้วย เนื่องจากเป็นพืชควบคุมของสหภาพยุโรปและมีสถิติการตรวจพบศัตรูพืช ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง รวมเป็นพืช 22 ชนิด มาตรการควบคุมพิเศษ EL มีการพิจารณาปรับปรุงแก้ไขมาอย่างต่อเนื่องเพื่อพัฒนาระบบการผลิตพืชผักผลไม้ส่งออกไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ให้ได้ตามมาตรฐานสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช และเป็นการแก้ไขปัญหาการปฏิเสธการนำเข้า เป็นการยกระดับการผลิต และส่งเสริมการส่งออก

วิธีการดำเนินงาน

ขั้นตอนที่ 1 การจัดประชุม

1.1 การประชุมหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

1.1.1 จัดประชุมหารือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ผู้ประกอบการโรงคัดบรรจุและผู้ส่งออกผักและผลไม้ไปสหภาพยุโรป แนวทางการแก้ไขปัญหาการส่งออกผักอันเนื่องมาจากปัญหาสุขอนามัยพืช

1.1.2. จัดประชุมชี้แจงทำความเข้าใจภารกิจงานภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษฯ กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของกรมวิชาการเกษตร

1.2 การประชุมร่วมภาครัฐและเอกชน

ขั้นตอนที่ 2 การจัดทำข้อกำหนด กฎระเบียบ หลักเกณฑ์ และเงื่อนไข

2.1 จัดทำหลักเกณฑ์และเงื่อนไข มาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ (Establishment List: EL)

2.2 การเจรจาหารือร่วมกับเจ้าหน้าที่รับผิดชอบด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชของสหภาพยุโรป

ขั้นตอนที่ 3 การฝึกอบรม

3.1 การจำแนกศัตรูพืชกักกันที่ติดไปกับสินค้าผักสดส่งออกสหภาพยุโรป

3.2 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการด้านระบบการควบคุมกระบวนการผลิต

ขั้นตอนที่ 4 การดำเนินการตามข้อกำหนด กฎระเบียบ หลักเกณฑ์ และเงื่อนไขตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

4.1 การตรวจสอบเอกสาร

4.2 การตรวจประเมินแปลงเกษตรกร

4.3 การตรวจประเมินโรงคัดบรรจุ

4.4 ประชุมพิจารณาเพื่อขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

4.5 การควบคุม กำกับ ดูแล โรงคัดบรรจุหลังจากได้รับการขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

4.6 การปรับปรุงและพัฒนามาตรการควบคุมพิเศษ EL

ขั้นตอนที่ 5 การประชาสัมพันธ์

การประชาสัมพันธ์เผยแพร่มาตรการควบคุมพิเศษ EL

ผลการดำเนินงานและวิจารณ์

1. การจัดประชุม

1.1 การประชุมหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง

1.1.1 การประชุมหารือแนวทางการแก้ไขปัญหาการส่งออกผักอันเนื่องมาจากปัญหาสุขอนามัยพืช

กมพ. เชิญประชุมผู้ประกอบการและหน่วยงานที่เกี่ยวข้องร่วมประชุมหารือประเด็นดังกล่าว ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคาร กวป. เป็นระยะอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2553 ต่อเนื่องถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2554 เพื่อรับทราบสถานการณ์และหารือร่วมกันในการแก้ไขปัญหา มติที่ประชุมให้ โดยผู้ประกอบการโรงคัดบรรจุต้องมีแปลงเกษตรกรที่เป็นเครือข่ายของตนเอง (Contract farming) และมีระบบควบคุมความปลอดภัยสินค้าด้านสารพิษตกค้าง เชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงการจัดการศัตรูพืช และระบบตามสอบสินค้า และภาครัฐให้การสนับสนุนองค์ความรู้ในด้านต่างๆ ให้กับผู้ประกอบการให้สามารถจัดทำระบบการควบคุมความปลอดภัยและการตรวจสอบย้อนกลับได้อย่างมีประสิทธิภาพ จนกระทั่งเดือนมีนาคม 2554 สามารถจัดทำหลักเกณฑ์และเงื่อนไข มาตรการควบคุมพิเศษ EL และกรมวิชาการเกษตรได้มีคำสั่งกรมวิชาการเกษตร ที่ 478/2554 ลงวันที่ 22 เมษายน 2554 เรื่องแต่งตั้งคณะกรรมการร่วมระหว่างภาครัฐและเอกชนแก้ปัญหาการส่งออกผักผลไม้ไปสหภาพยุโรป เพื่อพิจารณาแนวทางแก้ไขปัญหาสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช

1.1.2. การประชุมชี้แจงทำความเข้าใจภารกิจงานภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษฯ กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของกรมวิชาการเกษตร

มาตรการควบคุมพิเศษ EL อาศัยความร่วมมือจากหลายหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร โดยเฉพาะสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1 – 8 (สวพ. 1-8) ที่ทำหน้าที่ตรวจประเมินแปลงเกษตรกร เพื่อให้การดำเนินงานเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คณะทำงานฯ จึงจัดการประชุมชี้แจงทำความเข้าใจเรื่อง “การดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ (Establishment List)” ดังนี้

ครั้งที่ 1 เมื่อวันที่ 8 มีนาคม 2554 ณ ห้องเจรจาธุรกิจ ชั้น 1 อาคาร กวป.

ครั้งที่ 2 เมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2555 ณ ห้องประชุมอาคารเอนกประสงค์ สวพ. 4 อุบลราชธานี

ครั้งที่ 3 เมื่อวันที่ 14 สิงหาคม 2555 ณ ห้องประชุมโรงแรมชีวารี จันทบุรี

ครั้งที่ 4 เมื่อวันที่ 19 พฤศจิกายน 2555 ณ ห้องประชุมอาคารเอนกประสงค์ สวพ. 5 ชัยนาท

ครั้งที่ 5 เมื่อวันที่ 3 ธันวาคม 2555 ณ ห้องประชุมอาคารเอนกประสงค์ สวพ. 2 พิษณุโลก

1.2 การประชุมร่วมภาครัฐและเอกชน

คณะกรรมการร่วมระหว่างภาครัฐและเอกชนฯ เพื่อให้การดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL เป็นไปอย่างต่อเนื่องและเข้มแข็ง ตั้งแต่ ปี 2554 ถึง 2557 โดยประเด็นการประชุม ได้แก่

1) การรายงานความก้าวหน้าของการดำเนินการมาตรการควบคุมพิเศษ EL

2) การพิจารณาถึงแนวทางในการปฏิบัติในการขึ้นทะเบียนรายชื่อให้กับโรงคัดบรรจุ

3) การจัดอบรมวิธีการจัดการศัตรูพืชให้เจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพของโรงคัดบรรจุ

4) การพิจารณาบทลงโทษกรณีฝ่าฝืนหรือไม่ปฏิบัติตามเงื่อนไขของกรมวิชาการเกษตร

5) การพิจารณาร่างประกาศกรมวิชาการเกษตร เรื่องหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช สำหรับสินค้าผัก ผลไม้สดส่งออกไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส

6) การพิจารณาทบทวนแก้ไขตารางแนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2552

2. การจัดทำข้อกำหนด กฎระเบียบ หลักเกณฑ์ และเงื่อนไข

2.1 จัดทำหลักเกณฑ์และเงื่อนไข มาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ (Establishment List: EL)

คณะทำงานพิจารณา กำกับ ดูแล ตามประกาศกรมวิชาการเกษตรเรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการและเงื่อนไขการขอและการออกใบรับรองสุขอนามัย พ.ศ. 2552 ประชุมหารือจัดทำหลักเกณฑ์และเงื่อนไข ฯ เพื่อแก้ไขปัญหาการแจ้งเตือนด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช และพัฒนาระบบการผลิตผักและผลไม้สดเพื่อการส่งออกของประเทศไทย โดยจัดทำร่างมาตรการควบคุมพิเศษ EL และแจ้งเวียนหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ผู้ประกอบการโรงคัดบรรจุ รวมถึงผู้ส่งออกผักและผลไม้สด เพื่อขอข้อคิดเห็น และปรับแก้ไขร่างมาตรการควบคุมพิเศษฯ จนสามารถประกาศใช้มาตรการควบคุมพิเศษฯ ตั้งแต่ 8 มีนาคม 2554 เป็นต้นมา

หลักเกณฑ์และเงื่อนไขมาตรการควบคุมพิเศษฯ ครอบคลุมการควบคุมความปลอดภัยด้านเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีตกค้าง และการจัดการศัตรูพืชตลอดสายการผลิต โดยโรงคัดบรรจุที่ขอขึ้นทะเบียนต้องมีเกษตรกรเครือข่ายที่ได้รับการรับรอง GAP โรงคัดบรรจุต้องได้มาตรฐานสอดคล้องกับกฎระเบียบของสหภาพยุโรป มีแผนและผลควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของพืช รวมทั้งแผนและผลการทวนสอบระบบการผลิต ซึ่งมีหลักเกณฑ์พิจารณา ดังต่อไปนี้

1. ผลการตรวจประเมินแปลงเกษตรกร ดำเนินการ สวพ. 1-8 โดยแปลงเกษตรกรต้องผ่านการตรวจประเมิน GAP สำหรับพืชประกอบกับการจัดการศัตรูพืชและการใช้สารเคมีให้สอดคล้องกับข้อกำหนดของสหภาพยุโรป และเกษตรกรต้องเป็นเครือข่ายกับโรงคัดบรรจุ

2. ผลการตรวจประเมินโรงคัดบรรจุ ดำเนินการโดยกลุ่มพัฒนาระบบตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรสินค้าพืช

2.1 โรงคัดบรรจุต้องผ่านการตรวจประเมิน GMP และมีการนำหลักการระบบการ HACCP ไปประยุกต์ใช้ รวมถึงมีการจัดทำระบบตามสอบสินค้า

2.2 การตรวจประเมินโรงคัดบรรจุมีการสุ่มผลิตภัณฑ์สุดท้ายทุกชนิดพืชที่ขอขึ้นทะเบียนตามมาตรการ EL เพื่อทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีตกค้าง และศัตรูพืช เพื่อทวนสอบระบบการควบคุมการผลิต โดยมีหลักเกณฑ์ ดังนี้

ก) เชื้อจุลินทรีย์ (*E.coli* < 100 cfu/g, *Salmonella* spp. ต้องไม่พบ)

ข) สารเคมีตกค้าง (พบไม่เกินค่า Maximum Residue Levels: MRLs ตามมาตรฐานของสหภาพยุโรป และไม่พบสารเคมีที่สหภาพยุโรปไม่อนุญาตให้ใช้)

ค) ผลการตรวจสอบศัตรูพืช (ต้องไม่พบศัตรูพืชกักกันของสหภาพยุโรป)

2.3 การสอบวัดความรู้ ความเข้าใจ และความสามารถในการจำแนกศัตรูพืชของเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ (Quality Control: QC) ของโรงคัดบรรจุ โดยเจ้าหน้าที่ QC ทุกคนที่เข้าทดสอบจะต้องสอบผ่านให้ได้คะแนนร้อยละ 80

3. สถิติการตรวจพบศัตรูพืชในสินค้าพืช ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิในแต่ละเดือนร่วมด้วย โดยกำหนดให้สถิติการตรวจพบศัตรูพืชในแต่ละเดือนต้องลดลงร้อยละ 95

4. การพิจารณาเพื่อขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

การดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ กมพ. สคว. สอพ. สวพ. 1-8 และ กวป. แต่ละหน่วยงานดำเนินการในส่วนที่รับผิดชอบดังนี้

1. กองพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

1.1 คณะทำงานพิจารณา กำกับ ดูแล ตามประกาศกรมวิชาการเกษตรเรื่อง หลักเกณฑ์วิธีการและเงื่อนไขการขอและการออกใบรับรองสุขอนามัย พ.ศ. 2552

จัดทำร่างหลักเกณฑ์และเงื่อนไข มาตรการควบคุมพิเศษฯ ประชุมหน่วยงานที่เกี่ยวข้องผู้ประกอบการเพื่อหารือแนวทางการแก้ไขปัญหาอย่างต่อเนื่องเป็นระยะ ประชุมพิจารณาเอกสารควบคุมความปลอดภัยและการจัดการศัตรูพืช เพื่อการขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL และพิจารณาเอกสารควบคุมความปลอดภัยด้านสารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และการจัดการศัตรูพืชทุกๆ 6 เดือน หลักได้รับการขึ้นทะเบียน รวมถึงประชุมทำความเข้าใจมาตรการควบคุมพิเศษ EL ให้กับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องของกรมวิชาการเกษตร

1.2 กลุ่มพัฒนาระบบตรวจรับรองมาตรฐานสินค้า ตรวจประเมินตาม GMP และการนำหลักการระบบ HACCP ไปประยุกต์ใช้ รวมถึงการจัดทำระบบตามสอบสินค้า และตรวจติดตาม เฝ้าระวัง และทวนสอบระบบการควบคุมความปลอดภัยของโรงคัดบรรจุ

1.3 กลุ่มพัฒนาระบบความปลอดภัยสินค้าพืช ติดต่อประสานงาน และแลกเปลี่ยนข้อมูลกับสำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ และ DG SANCO สหภาพยุโรป รวบรวมสรุปข้อมูลการตรวจสอบรับรองและการแจ้งเตือนด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช

1.4 กลุ่มประสานการตรวจรับรองมาตรฐาน จดทะเบียนผู้ส่งออกผักผลไม้สด ตรวจสอบและออกใบรับรองสุขอนามัย ประสานงานและบริหารจัดการข้อมูลสถานะแปลงเกษตรกรและโรงคัดบรรจุ

1.5 กลุ่มพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพสินค้า ตรวจวิเคราะห์สารเคมีตกค้าง และเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อประกอบการพิจารณาขึ้นทะเบียน พิจารณาผลทดสอบและลงนามใบรับรองสุขอนามัย พัฒนาศักยภาพห้องปฏิบัติการทดสอบให้ได้รับการรับรองมาตรฐาน ISO/IEC 17025 เพิ่มเติม

1.6 กลุ่มพัฒนาระบบตรวจรับรองมาตรฐานการผลิต ประสานงานกับ สวพ. 1-8 เรื่องการทวนสอบสถานภาพการรับรองแปลงเกษตรกร

2. สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร ทบทวนปรับปรุงระบบการตรวจสอบรับรองสุขอนามัยพืช

3. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ทดลองวิจัยสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อจัดทำคู่มือคำแนะนำการใช้สารเคมีและการป้องกันกำจัดศัตรูพืชสำหรับสินค้าผักผลไม้เพื่อการส่งออกสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส

4. สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขตที่ 1-8 ตรวจประเมินแปลงเกษตรกรตาม GAP สำหรับพืชประกอบกับการจัดการศัตรูพืชและการใช้สารเคมีให้สอดคล้องกับข้อกำหนดของสหภาพยุโรป ตรวจติดตาม เฝ้าระวัง และทวนสอบระบบการควบคุมความปลอดภัยของแปลงเกษตรกร

5. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรร่วมกับสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชจัดทำแบบทดสอบการจำแนกศัตรูพืช สำหรับทดสอบความรู้ความเข้าใจของเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพของโรงคัดบรรจุ ตรวจสอบศัตรูพืชในตัวอย่างสินค้าที่ขอขึ้นทะเบียน

2.2 การเจรจาหารือร่วมกับเจ้าหน้าที่รับผิดชอบด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ของสหภาพยุโรป

คณะผู้แทนกรมวิชาการเกษตร ร่วมกับสำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำสหภาพยุโรปประชุมหารือร่วมกับ DG SANCO อย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปลายปี 2553 - 2556 โดยกรมวิชาการเกษตร ได้ทบทวนแก้ไขระบบการตรวจสอบและออกใบรับองสุขอนามัยพืช และสถิติการแจ้งเตือนศัตรูพืชลดลงเมื่อเทียบกับสถิติก่อนปี 2554 และมีแผนจะขยายขอบข่ายพืชผักในกลุ่มภายใต้ Regulation 669/2009 เข้าสู่ระบบมาตรการควบคุมพิเศษ EL

3. การฝึกอบรม

กมพ. ได้จัดการฝึกอบรมเพิ่มองค์ความรู้ให้กับผู้ประกอบการให้สามารถดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL ได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลักสูตรการฝึกอบรม ดังนี้

3.1 การจำแนกศัตรูพืชกักกันที่ติดไปกับสินค้าผักสดส่งออกสหภาพยุโรป เริ่มตั้งแต่ปี 2555 จนถึงปัจจุบัน รวมจำนวน 6 ครั้งๆ ละ 70 -130 คน ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคาร กวป.

3.2 การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการด้านระบบการควบคุมกระบวนการผลิต

3.2.1 เรื่อง “การประยุกต์ใช้หลักการ HACCP และระบบ GMP สำหรับโรงคัดบรรจุเพื่อป้องกันหรือลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในพืชสมุนไพร” และการฝึกอบรม เรื่อง “การยืนยันความถูกต้องในระบบ HACCP สำหรับโรงคัดบรรจุ” ณ ห้องประชุมโรงแรมริชมอนด์ จังหวัดนนทบุรี จำนวน 4 รุ่น ๆ ละ 50 คน

3.2.2 เรื่อง “การประเมินแผน GMP และ HACCP เพื่อป้องกันหรือลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในพืชสมุนไพร” ณ ห้องประชุมโรงแรมริชมอนด์ จังหวัดนนทบุรีจำนวน 1 รุ่นๆ 50 คน

4. การดำเนินการตามข้อกำหนด กฎระเบียบ หลักเกณฑ์ และเงื่อนไขตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

4.1 การตรวจสอบเอกสาร

คณะทำงานฯ ตรวจสอบและพิจารณาเอกสารที่บริษัทยื่นขอรวม 40 ราย เอกสารครบถ้วนถูกต้อง ตามหลักเกณฑ์การจัดทำเอกสารมาตรการควบคุมพิเศษ EL จำนวน 33 ราย โดยเอกสารแปลงเกษตรกรจะส่งไปยัง สวพ. ที่เกี่ยวข้อง เพื่อตรวจประเมินแปลงเกษตรกร เอกสารในส่วนของโรงคัดบรรจุส่งให้กลุ่มพัฒนาระบบตรวจรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กมพ. เพื่อตรวจประเมินโรงคัดบรรจุ

4.2 การตรวจประเมินแปลงเกษตรกร

สวพ. 1-8 (ที่เกี่ยวข้อง) ดำเนินการตรวจประเมินแปลงเกษตรกรตาม GAP รวมถึงการประเมินแผนและผลการควบคุมในแปลงปลูก เอกสารบันทึกต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง จากนั้นส่งผลการตรวจประเมินให้คณะทำงานฯ เพื่อเสนอที่ประชุมพิจารณา

4.3 การตรวจประเมินโรงคัดบรรจุ

กลุ่มพัฒนาระบบตรวจรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กมพ. ตรวจประเมินโรงคัดบรรจุตามหลัก GMP และการนำหลักการระบบ HACCP ไปประยุกต์ใช้ ระบบตามสอบสินค้า รวมถึงมีการประเมินแผนและผลการควบคุมระบบความปลอดภัยของสินค้าพืช ด้านสารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และศัตรูพืช

4.4 การประชุมพิจารณาเพื่อขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

คณะทำงานฯ ประชุมเพื่อขึ้นทะเบียนโรงคัดบรรจุ ชนิดพืช และแปลงเกษตรกร ทุกสัปดาห์ เมื่อคณะทำงานฯ มีมติให้ขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL เลขานุการคณะทำงานฯ ทำหนังสือแจ้งการขึ้นทะเบียนฯ แจ้งให้โรงคัดบรรจุทราบ ปัจจุบันมีโรงคัดบรรจุที่ได้รับการขึ้นทะเบียน จำนวน 27 โรง รวม 19 ชนิดพืช ได้แก่ กวางตุ้ง กะเพรา กุ่ยฉ่าย ขึ้นฉ่าย คะน้า ต้นหอม

ถั่วฝักยาว ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ผักบุ้งจีน พริก มะเขือขาว มะเขือเปราะ มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะระจีน มะระขี้นก สะระแหน่ โหระพา แปลงเกษตรกรที่ได้รับการขึ้นทะเบียน จำนวน 519 แปลง จากนั้นจะทำหนังสือแจ้งข้อมูลการขึ้นทะเบียนโรงคัดบรรจุให้ DG SANCO ทราบต่อไป

4.5 การควบคุม กำกับ ดูแล โรงคัดบรรจุหลังจากได้รับการขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL

4.5.1 ประเมินผลการควบคุมความปลอดภัยของสินค้า

โรงคัดบรรจุ ต้องส่งผลการควบคุมความปลอดภัยของสินค้าพืชที่ได้รับการขึ้นทะเบียนให้คณะทำงานฯ ประเมินผลการควบคุมความปลอดภัย ความถี่ทุก 6 เดือน โดยแผนการควบคุมความปลอดภัยต้องครอบคลุมความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ สารเคมีตกค้าง รวมถึงการจัดการศัตรูพืช ตลอดทั้งกระบวนการผลิต ตั้งแต่การผลิตในแปลงและโรงคัดบรรจุ

กรณีโรงคัดบรรจุไม่ส่งผลการควบคุมความปลอดภัยตามที่กำหนด คณะทำงานฯ จะพิจารณาระงับและ/หรือเพิกถอนการขึ้นทะเบียนตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL โดยมีการเพิกถอนแล้ว จำนวน 3 ราย

4.5.2 การตรวจสอบและออกใบรับรองสุขอนามัย

พนักงานเจ้าหน้าที่ของ กมพ. ตรวจสอบเอกสารของโรงคัดบรรจุที่ได้รับการขึ้นทะเบียน หากเอกสารครบถ้วนถูกต้องตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและออกใบรับรองสุขอนามัย พ.ศ. 2552 พนักงานเจ้าหน้าที่ดำเนินการออกใบรับรองสุขอนามัย

4.5.3 การตรวจสอบและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช

พนักงานเจ้าหน้าที่ของด่านตรวจพืช สคว. ตรวจสอบเอกสารและสุ่มตัวอย่างพืชเพื่อตรวจสอบศัตรูพืช หากเอกสารครบถ้วน ถูกต้อง และไม่พบศัตรูพืช เจ้าหน้าที่จะดำเนินการออกใบรับรองสุขอนามัยพืช โดยสถิติการตรวจพบศัตรูพืชภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิก่อนการส่งออกมีแนวโน้มลดลง (Table1) และสถิติการส่งออกพืชภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL มีแนวโน้มสูงขึ้นเป็นลำดับ (Table2)

4.5.4 ตรวจติดตาม เฝ้าระวัง และทวนสอบระบบการควบคุมความปลอดภัย

4.5.4.1 แปลงเกษตรกร มีการตรวจติดตามระบบการควบคุมความปลอดภัยและการจัดการศัตรูพืช อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง

4.5.4.2 โรงคัดบรรจุ โดยการทวนสอบระบบควบคุม ณ โรงคัดบรรจุ กิจกรรมที่ดำเนินการ ความถี่ในการตรวจติดตาม เฝ้าระวัง และทวนสอบระบบการควบคุมความปลอดภัยขึ้นอยู่กับจำนวนชนิดพืชและระยะเวลาที่ได้รับการขึ้นทะเบียน ประวัติการได้รับการแจ้งเตือน

4.5.5 การดำเนินการหลังได้รับการแจ้งเตือน เมื่อได้รับการแจ้งเตือนปัญหาสุขอนามัยผ่านระบบ RASFF ปัญหาสุขอนามัยพืชผ่านระบบ EUROPHYT และการตรวจพบศัตรูพืช

ณ ด่านตรวจพืชฯ กมพ. แจ้งเวียนไปยังหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อตรวจสอบข้อมูล และดำเนินการในส่วนที่เกี่ยวข้อง

4.5.5.1 แปลงเกษตรกร เจ้าหน้าที่ทวนสอบระบบควบคุมแปลงเกษตรกรที่ได้รับการขึ้นทะเบียน และสุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีตกค้าง หรือ ศัตรูพืช (แล้วแต่กรณีที่ได้รับการแจ้งเตือน) จากนั้นสรุปผลการตรวจติดตามเสนอคณะกรรมการพิจารณา

4.5.5.2 โรงคัดบรรจุ

1) กมพ. ทำหนังสือแจ้งเตือนโรงคัดบรรจุตามระเบียบและ/หรือประกาศกรมวิชาการเกษตรที่เกี่ยวข้อง เพื่อค้นหาสาเหตุพร้อมการแก้ไขปัญหา

2) กมพ. เข้าตรวจประเมินการค้นหาสาเหตุและแนวทางการแก้ไขปัญหาของโรงคัดบรรจุ และตามสอบสินค้ารุ่นที่พบปัญหาตลอดสายการผลิต

3) ตรวจติดตามเพื่อทวนสอบระบบควบคุมที่ได้รับการขึ้นทะเบียน

4) สุ่มตัวอย่างเพื่อทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีตกค้าง หรือ ศัตรูพืช (แล้วแต่กรณีที่ได้รับการแจ้งเตือน)

4) สรุปผลการตรวจติดตาม

4.5.5.3 ผู้ส่งออก

ทำหนังสือแจ้งเตือนโรงคัดบรรจุตามประกาศกรมวิชาการเกษตรที่เกี่ยวข้อง เพื่อค้นหาสาเหตุพร้อมการแก้ไขปัญหา

4.5.5.4 กมพ. รวบรวมข้อมูลการสืบสวนหาสาเหตุและแนวทางการแก้ไขที่สมบูรณ์และจัดทำรายงาน (Investigation report) แจ้ง DG SANCO

5.6 การปรับปรุงและพัฒนามาตรการควบคุมพิเศษ EL

ตั้งแต่ปี 2554 ถึง ปัจจุบัน คณะทำงานฯ ได้รวบรวมปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงานในส่วนของหน่วยงานภาครัฐ โรงคัดบรรจุ และเกษตรกร เพื่อหาแนวทางการแก้ไข ปรับปรุง พัฒนาให้มาตรการควบคุมพิเศษ EL สามารถดำเนินการไปได้อย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ ดังนี้

1) การพัฒนาแบบฟอร์มการตรวจเอกสารการขอขึ้นทะเบียน (Check list) เพื่อแก้ไขปัญหาผู้ประกอบการโรงคัดบรรจุส่งเอกสารไม่ครบถ้วน ถูกต้อง

2) การพัฒนาแบบฟอร์มการตรวจประเมินแปลงเกษตรกร เนื่องจากแปลงและหน่วยตรวจประเมินแปลงมีอยู่ทั่วประเทศ เพื่อให้ผู้ตรวจประเมินดำเนินการตรวจให้ครอบคลุมครบทุกหัวข้อ และเป็นไปในทิศทางเดียวกัน

3) การพัฒนาระบบตรวจสอบและแลกเปลี่ยนข้อมูลแปลงเกษตรกรที่ได้รับการขึ้นทะเบียน เพื่อตรวจสอบสถานภาพการรับรอง และกำลังการผลิตพืช เพื่อแก้ไขปัญหาการแจ้งข้อมูลการผลิตพืชของแปลงเกษตรกรที่ไม่สอดคล้องกับการขอออกใบรับรองสุขอนามัย รวมถึงข้อมูลการ

แจ้งเตือนจากต่างประเทศเพื่อการตามสอบสินค้านำไปสู่การแจ้งเตือนผู้เกี่ยวข้องเพื่อค้นหาสาเหตุและแนวทางการแก้ไข

4) การพัฒนาความร่วมมือระหว่างภาครัฐและเอกชนเพื่อสร้างเครือข่ายที่มีวัตถุประสงค์ในการแก้ไขปัญหาการส่งออกผักและผลไม้ไปยังสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส ร่วมกัน

5. การประชาสัมพันธ์เผยแพร่มาตรการควบคุมพิเศษ EL

5.1 คู่มือ หลักเกณฑ์การจัดทำเอกสารมาตรการควบคุมพิเศษ EL

คณะทำงานฯ ได้ประชุมหารือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง รวบรวมข้อมูล และจัดทำเอกสารคู่มือฯ เช่น คู่มือเป็นแนวทางในการจัดทำเอกสารเพื่อขอเข้าร่วมมาตรการควบคุมพิเศษ EL การสืบค้นสถานภาพสารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชและค่า MRLs ของสหภาพยุโรป การแก้ไขปัญหาศัตรูพืชในแปลงผลิตพืชผักสดและสรุปข้อมูลคำแนะนำการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช รวมถึงวิธีการกำจัดศัตรูพืชกักกันหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อแจกจ่ายให้กับเจ้าหน้าที่ของกรมวิชาการเกษตรและผู้ประกอบการโรงคัดบรรจุ

5.2 โปสเตอร์

กมพ. ร่วมกับ สอพ. จัดทำโปสเตอร์ภาพแมลงศัตรูสำคัญในพืชส่งออก เพื่อมอบให้หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรที่เกี่ยวข้องและแจกจ่ายให้กับเจ้าหน้าที่โรงคัดบรรจุผักผลไม้สดส่งออกไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์ และสมาพันธรัฐสวิส

5.3 วารสาร

วารสารเพื่อนเกษตร ปีที่ 7 ฉบับที่ 82 เดือนตุลาคม 2554 คอลัมน์เปิดเล่ม โดยเสริมสุข สลักเพ็ชร์

น.ส.พ. กสิกร ปีที่ 85 ฉบับที่ 5 กันยายน-ตุลาคม 2555 เรื่อง อียู ปลดล็อกผักสดไทยส่งออกฉลุย โดยประภาส ทรงหงษา

น.ส.พ. กสิกร ปีที่ 86 ฉบับที่ 2 มีนาคม-เมษายน 2556 เรื่อง มาตรการควบคุมพิเศษกับการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป โดยรุ่งทิวา รอดจันทร์

5.4 จัดนิทรรศการหัวข้อ “มาตรการควบคุมพิเศษ EL”

นิทรรศการ “งานวิจัยใช้ได้จริง” ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 28 – 30 สิงหาคม 2554 ณ บริเวณโดยรอบอาคาร สวป.

การประชุม เรื่อง การตรวจประเมินแปลงเกษตรกรตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL วันที่ 6 มีนาคม 2555 ณ ห้องประชุม สวพ.4 อุบลราชธานี

นิทรรศการ “เปิดบ้าน งานวิจัย กรมวิชาการเกษตร” วันที่ 28 – 30 พฤษภาคม 2557 ณ บริเวณโดยรอบอาคารกสิกรรม กรมวิชาการเกษตร

5.5 ประชุม สัมมนา ฝึกอบรมในหัวข้อ “มาตรการควบคุมพิเศษ EL”

การฝึกอบรมการปฏิบัติตามมาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกสินค้าพืชไปสหภาพยุโรป เมื่อวันที่ 20 มิถุนายน 2555 ณ ห้องประชุมโรงแรมเวล จังหวัดนครปฐม

การฝึกอบรมผู้ตรวจประเมินแปลงตามระบบ GAP เมื่อวันที่ 20 ธันวาคม 2555 ณ ห้องประชุมอาคารสัมมนาบึงฉวากรีสอร์ท จังหวัดสุพรรณบุรี

การฝึกอบรมหลักสูตรการจำแนกศัตรูพืชให้กับเจ้าหน้าที่โรงคัดบรรจุผักผลไม้สดส่งออก เมื่อวันที่ 8 – 9 พฤษภาคม 2556 ณ ห้องประชุมใหญ่ กวป.

การฝึกอบรมหลักสูตรการจำแนกศัตรูพืชให้กับเจ้าหน้าที่โรงคัดบรรจุผักผลไม้สดส่งออก เมื่อวันที่ 12 มีนาคม 2557 ห้องประชุมใหญ่ อาคาร กวป.

5.6 จัดการศึกษา ดูงาน

DG SANCO ได้ร้องขอให้ประเทศไทยจัดการศึกษาดูงานเรื่อง “มาตรการควบคุมพิเศษ EL” ให้กับคณะเจ้าหน้าที่ของประเทศเวียดนาม เมื่อวันที่ 18 – 20 พฤษภาคม 2555

โครงการสัมมนาระหว่างประเทศของคณะทำงานความร่วมมือไทย-ลาว ภายใต้กรอบความร่วมมือด้านการเกษตร (Agriculture Cooperation Framework) เรื่อง การพัฒนาระบบกักกัน โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ได้ขอความร่วมมือให้จัดการบรรยายและศึกษาดูงานเรื่องระบบควบคุมและกำกับดูแลสินค้าเกษตรของไทยตั้งแต่ระดับฟาร์มจนถึงการส่งออกผักไปสหภาพยุโรป ระหว่างวันที่ 9 – 11 กันยายน 2557 ให้กับเจ้าหน้าที่กรมปลูกฝัง กระทรวงกสิกรรมและป่าไม้ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

สรุปผลการดำเนินงาน

การดำเนินการมาตรการควบคุมพิเศษ EL อาศัยการบูรณาการความร่วมมือของหลายหน่วยงานในการดำเนินการให้บรรลุวัตถุประสงค์และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อแก้ไขปัญหาและสนับสนุนการส่งออกสินค้าผักผลไม้สด ซึ่งผลการดำเนินงานประสบความสำเร็จเป็นลำดับ ปัจจุบันมีโรงคัดบรรจุที่ได้รับการขึ้นทะเบียน จำนวน 27 โรง สามารถส่งออกพืชภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL ได้เพิ่มขึ้นมาตรการควบคุมพิเศษ EL สามารถลดสถิติการแจ้งเตือนตรวจพบศัตรูพืชอย่างมีนัยสำคัญ (Table3) นอกจากนี้สหภาพยุโรปยังได้ยกเลิกรายการตรวจสอบและลดอัตราการสุ่มตรวจสอบสารตกค้างและการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ตาม Regulation 669/2009 โดยยกเลิกรายการตรวจสอบพืชคะน้าและกวางตุ้ง และปรับลดการสุ่มตรวจสารตกค้างในถั่วฝักยาว มะเขือ กะเพรา โหระพา สะระแหน่ ผักชีไทย (Table4)

การดำเนินงานมีการทวนสอบยืนยันจากหน่วยงานภายนอก โดยสหภาพยุโรปได้จัดคณะผู้ตรวจประเมิน FVO เดินทางมาตรวจประเมินเมื่อวันที่ 9 – 18 ตุลาคม 2555 สรุปประเด็นจากการตรวจประเมิน พบว่า กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินมาตรการควบคุมพิเศษ EL สำหรับการส่งออกพืช

5 กลุ่ม 16 ชนิด โดยมีการพัฒนาการกระบวนการส่งออกเป็นอย่างมาก และมีการควบคุมระบบการผลิตที่ดีขึ้น ครอบคลุมการจัดการแหล่งผลิต และโรงคัดบรรจุในด้านสารเคมีตกค้าง การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และศัตรูพืช เป็นระบบที่มีความเชื่อมโยงต่อเนื่อง และมีความเข้มแข็ง (consistent and robust system) โดยผู้ประกอบการต้องมีความพยายามอย่างมากในการปรับปรุงและใช้การลงทุนในการควบคุม ระบบการตรวจสอบรับรองสุขอนามัยพืช ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิได้รับการพัฒนาและมีความเข้มแข็งเป็นอย่างมากเพื่อให้เป็นไปตามกฎระเบียบของสหภาพยุโรป ล่าสุด FVO ได้เดินทางมาตรวจประเมินระบบควบคุม ตรวจสอบรับรองสารตกค้าง และสุขอนามัยพืชในสินค้าเกษตรส่งออกจากไทยไปสหภาพยุโรป เมื่อวันที่ 29 มกราคม – 7 กุมภาพันธ์ 2557 พบว่า การจัดทำมาตรการควบคุมพิเศษ EL และการให้สิทธิประโยชน์แก่ผู้ประกอบการที่มีระบบการควบคุมตามมาตรฐานที่กำหนด เป็นการส่งเสริมผู้ประกอบการให้รับผิดชอบเรื่องความปลอดภัยและสุขอนามัยพืช นอกจากนี้กรมวิชาการเกษตรยังได้จัดทำแผนการตรวจติดตาม (Monitoring program) ณ แหล่งผลิต และโรงคัดบรรจุ ประกอบกับการจัดทำคู่มือต่างๆ เพื่อช่วยส่งเสริมให้ผู้ประกอบการเกษตรกร และเจ้าหน้าที่ปฏิบัติงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งมีการติดตามหาสาเหตุและมาตรการดำเนินการกรณีมีการแจ้งเตือนตรวจพบสารตกค้างในสินค้าผักผลไม้ผ่านระบบ RASFF ของสหภาพยุโรป ในส่วนสุขอนามัยพืชเพื่อเป็นการทวนสอบยืนยันผลการดำเนินการที่กรมวิชาการเกษตรแจ้งเป็นหนังสือต่อ DG SANCO และขอทราบข้อมูลมาตรการที่จัดทำเพิ่มเติม ซึ่งพบว่ากรมวิชาการเกษตรได้มีการดำเนินการตามแผนการที่เสนอ โดยสหภาพยุโรปได้มีหนังสือวันที่ 12 สิงหาคม 2557 ยอมรับในผลการจัดทำระบบมาตรการควบคุมพิเศษ EL และล่าสุดได้มีการออกกฎระเบียบที่ 1295/2014 ยกเลิกรายการตรวจสอบสารตกค้างและเชื้อจุลินทรีย์ในพืชกะเพรา โหระพา สะระแหน่ และผักชีไทย โดยจะมีผลตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2558 เป็นต้นไป

การนำไปใช้ประโยชน์

1. มาตรการควบคุมพิเศษ EL สามารถยกระดับการผลิตสินค้าผักสดส่งออกของไทย บนพื้นฐานมาตรฐานสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับระบบการผลิตสินค้าอื่นๆ ให้เป็นแนวทางเดียวกันได้
2. มาตรการควบคุมพิเศษ EL ส่งผลให้เกิดการสนับสนุนอื่นๆ เพื่อให้การดำเนินงานสามารถบรรลุผลสำเร็จ ได้แก่ งานวิจัยวิธีการกำจัดแมลงศัตรูพืชกักกันหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่สอดคล้องกับมาตรฐานสหภาพยุโรป งานวิจัยการใช้เทคนิคลดปริมาณศัตรูพืชภายหลังการเก็บเกี่ยว การปรับปรุงกระบวนงานตรวจสอบรับรองด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช
3. มาตรการควบคุมพิเศษ EL กระตุ้นให้เกิดการตื่นตัว และสร้างความรับผิดชอบร่วมกันในด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชในการผลิตผักสดให้เกิดขึ้นในกลุ่มเกษตรกรเครือข่ายและผู้ประกอบการ

โรงคัดบรรจุที่ผลิตผักสดจำหน่ายทั้งตลาดภายในและต่างประเทศ อันเป็นผลดีกับผู้บริโภคที่จะได้บริโภคผักสดที่มีคุณภาพและความปลอดภัย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายจิรากร โกศัยเสวี อดีตอธิบดีกรมวิชาการเกษตร นายวิชา ธิติประเสริฐ อดีตผู้อำนวยการสำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำสหภาพยุโรป เจ้าหน้าที่ตรวจประเมินโรงคัดบรรจุ กมพ. เจ้าหน้าที่ตรวจประเมินแปลง สวพ. 1-8 สคว. สอพ กวป. สำนักนิติการและสิทธิประโยชน์ ผู้ประกอบการโรงคัดบรรจุ และเกษตรกรที่เข้าร่วมมาตรการควบคุมพิเศษ EL

ปัญหาและอุปสรรค

การดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL มีความเชื่อมโยงเกี่ยวกับหลายหน่วยงานภายใต้กรมวิชาการเกษตร ปัญหาและอุปสรรคหลักที่เกี่ยวข้องกับการแก้ไขปัญหา ได้แก่ องค์ความรู้เกี่ยวกับการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชก่อนการเก็บเกี่ยว กรรมวิธีการลดหรือกำจัดศัตรูพืชหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อให้สอดคล้องกับข้อกำหนดด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชของสหภาพยุโรป เนื่องจากความแตกต่างของค่าปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างสูงสุด (MRLs) ความแตกต่างชนิดศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pests) ซึ่งที่ผ่านมากรมวิชาการเกษตรยังขาดการพัฒนาองค์ความรู้เพื่อใช้ในการสนับสนุนการแก้ไขปัญหาระบบการผลิตอย่างเป็นระบบ การดำเนินการตามมาตรการควบคุมพิเศษ EL ผลักดันให้เกิดการพัฒนาองค์ความรู้ดังกล่าวเพื่อถ่ายทอดให้กับเกษตรกรและโรงคัดบรรจุ อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง

ระบบการผลิตภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL กำหนดให้โรงคัดบรรจุต้องมีการควบคุมการผลิตให้เป็นไปตามมาตรฐานสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชบนพื้นฐานการวิเคราะห์ความเสี่ยงของโรงงาน (Self control) ส่งผลให้เกิดความรับผิดชอบมากยิ่งขึ้นโดยนำเอาหลักการให้รางวัลและการกำหนดโทษ (Carrot and stick) มาใช้พัฒนาระบบการส่งออก ผู้ประกอบการที่มีความพร้อมสามารถปรับตัวและพัฒนาเข้าสู่ระบบการผลิตภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL แต่สำหรับผู้ประกอบการที่ยังขาดความพร้อม โดยเฉพาะด้านองค์ความรู้ กรมวิชาการเกษตรจำเป็นต้องให้การส่งเสริมสนับสนุนเพื่อเพิ่มศักยภาพให้สามารถพัฒนาเข้าสู่ระบบการผลิตภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL ให้มากยิ่งขึ้น

ปัญหาความรู้ ความเข้าใจที่ไม่ถูกต้องตรงกันในการปฏิบัติงานภายใต้มาตรการควบคุมพิเศษ EL จึงมีความจำเป็นต้องประชุมหารือทำความเข้าใจระหว่างหน่วยงานอย่างต่อเนื่องเพื่อให้การปฏิบัติสอดคล้องและเป็นไปในทิศทางเดียวกัน อีกทั้งเป็นการพัฒนาระบบให้มีความเข้มแข็ง และยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

ประกาศกรมวิชาการเกษตร. 2552. เรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและการออกใบรับรองสุขอนามัย พ.ศ. 2552 ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 12 ตอนพิเศษ 114 ง. วันที่ 14 สิงหาคม 2552. หน้า 36-39

ประกาศกรมวิชาการเกษตรเรื่อง หลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไขการขอและออกใบรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับสินค้าผักผลไม้สดส่งออกไปสหภาพยุโรป นอร์เวย์และสมาพันธรัฐสวิส พ.ศ. 2556. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 48 ง. วันที่ 17 เมษายน 2556. หน้า 27-30

ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดพืชเป็นพืชควบคุมเฉพาะ พ.ศ. 2556. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 158 ง. วันที่ 14 พฤศจิกายน 2556. หน้า 12

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช, กรมวิชาการเกษตร. 2556. คู่มือหลักเกณฑ์การจัดทำเอกสารมาตรการควบคุมพิเศษ ELระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ (Establishment List: EL). บริษัท แฮนดี เพรส จำกัด. 42 หน้า

Commission Regulation No 669/2009 of 24 July 2009 implementing Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the increased level of official controls on imports of certain feed and food of non-animal origin and amending Decision 2006/504/EC, 2009, O.J. L194/11.

Table 1 Pest interceptions in commodities under the special control scheme for establishment list prior to export at Suvarnnabhumi International Airport Plant Quarantine Station

Year	No. of interception	Commodity	Pest
Jan-March 2011	2242	Holy basil , Sweet basil, Stinking, Hairy Basil, Balsam pear, Egg plant, Chilli, Celery, Mint, Tree Basil, Chinese kale, Coriander, Yard long beans and Chinese cabbage	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny *Lepidoptera* *Spodoptera Aphids*
April-Dec 2011*	2367	Chinese cabbage, Chinese kale ,Celery, Yard long beans, Mint Coriander, Holy basil , Sweet basil, Egg plant and Chilli	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny *Lepidoptera* *Spodoptera*
2012	30	Holy basil , Sweet basil, Egg plant, Chilli Chinese kale, Coriander and Balsam pear	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny
2013	28	Basil, Sweet basil, Egg plant, Chilli, Chinese kale, Coriander, Stinking, Yard long beans and Balsam pear	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny *Lepidoptera* *Spodoptera*
Jan-Nov 2014	7	Sweet basil, Egg plant, Chilli, Holy basil and Celery	*Liriomyza sativae* Blanchard *Bemisia tabaci* (Genn.) *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny *Leucinodes orbonalis Spodoptera*

Source: Suvarnabhumi International Airport Plant Quarantine Station, Office of Agricultural Regulation

Note: *The special control scheme was introduced in March 2011 for 16 kinds of vegetables

Table 2 Export of commodities under the special control scheme for establishment list to the European Union between 2008-2014

Commodity	2008 (kg)	2009 (kg)	2010 (kg)	2011 (kg)	2012 (kg)	2013 (kg)	Jan-Jun 2014(kg)
Chilli/ bird chilli	650,731	657,026	767,906	162,532	60,112	100,475	200,440
Balsam pear / Bitter gourd	310,808	271,773	249,403	43,257	3,018	38,278	79,634
Holy basil	160,219	178,084	161,491	13,111	2,595	12,630	24,491
Egg plant	623,407	618,884	432,804	96,952	49,438	114,519	272,999
Stinking	137,229	152,107	147,997	22,851	1,503	7,304	13,201
Sweet basil	601,646	647,141	643,158	87,686	25,067	65,553	94,005
Mint	3,708	22,719	20,575	2,882	100	0	0
Celery	7,943	48,611	48,251	23,553	3,539	8,017	21,923
Chinese cabbage	5,896	34,786	34,594	24,200	1,343	268	1,540
Chinese kale	12,530	77,983	28,103	11,883	1,242	7,956	16,310
Coriander	61,850	387,134	336,612	291,256	72,310	99,257	165,121
Yard long beans	77,879	440,568	193,157	218,605	23,740	78,325	118,424
Hairy Basil	26,151	37,003	28,584	1,520	0	0	0
Tree Basil	534	537	567	3	0	0	0
Total	**2,680,530**	**3,574,356**	**3,093,202**	**1,000,291**	**244,007**	**532,582**	**1,008,088**

Source: Suvarnabhumi International Airport Plant Quarantine Station, Office of Agricultural Regulation

Table 3 Pest interceptions in exported commodities under the special control scheme for establishment list reported via EUROPHYT

Year	No. of interception	Commodity	Pest
2553	368	Holy basil , Sweet basil, Stinking, Hairy Basil, Balsam pear, Egg plant, Chilli, Celery, Chinese kale and Bitter gourd	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Liriomyza sativae* Blanchard *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny
Jan-March 2011	43	Holy basil , Sweet basil, Stinking, Balsam pear, Egg plant, Chilli, Celery, Coriander and Yard long beans	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Liriomyza sativae* Blanchard *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny
April-Dec 2011*	14	Celery and Chinese kale	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Liriomyza sativae* Blanchard
2012	3	Sweet basil and Egg plant	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Liriomyza sativae* Blanchard *Leucinodes orbonalis*
2013	10	Balsam pear Celery, Sweet basil, Egg plant, Chilli and Stinking	*Bemisia tabaci* (Genn.) *Liriomyza sativae* Blanchard *Leucinodes orbonalis* *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny
Jan-Nov 2014	10	Egg plant, Stinking, Chilli, Holy basil and Coriander	*Leucinodes orbonalis* *Bemisia tabaci* (Genn.) *Tephritidae* *Thrips palmi* Karny *Spodoptera*

Source: Food Safety of Plants and Plant Products Group, Plant Standard and Certification Office

Note: *The special control scheme was introduced in March 2011 for 16 kinds of vegetables

Table 4 Changes of official inspection control level under Regulation 669/2009 for pesticides residues and microbiological contamination

Regulation	Commodity	Measure	Effective date
669/2009	Yard long beans, Egg plant and Chinese cabbage	50% Sampling for pesticides residues analysis	January 2009
878/2010	Yard long beans, Egg plant and Chinese cabbage	50% Sampling for pesticides residues analysis	October 2009
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	20% Sampling for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
4333/2011	Yard long beans, Egg plant and Chinese cabbage	50% Sampling for pesticides residues analysis	July 2011
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	20% Sampling for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	
1235/2012	Yard long beans, Egg plant and Chinese cabbage	Reduce level of sampling to 20% for pesticides residues analysis	January 2013
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	20% Sampling for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	

Regulation	Commodity	Measure	Effective date
270/2013	Yard long beans, Egg plant and Chinese cabbage	20% Sampling for pesticides residues analysis	April 2013
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	20% Sampling for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	
618/2013	Yard long beans and Egg plant	20% Sampling for pesticides residues analysis	July 2013
	Chinese cabbage	Reduce level of sampling to 10% for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	Reduce level of sampling to 20% for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	

Regulation	Commodity	Measure	Effective date
1355/2013	Yard long beans and Egg plant	20% Sampling for pesticides residues analysis	January 2014
	Chinese cabbage	Remove from the list for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	10% Sampling for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	
1021/2014	Yard long beans and Egg plant	20% Sampling for pesticides residues analysis	October 2014
	Holy basil, Sweet basil and Coriander	10% Sampling for pesticides residues analysis	
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	
	Betel leaf	10% Sampling for *Salmonella* analysis	
1295/2014	Yard long beans and Egg plant	20% Sampling for pesticides residues analysis	January 2015
	Holy basil, Sweet basil, Coriander and Mint	Remove from the list for pesticides residues and *Salmonella* analysis	
	Chilli	10% Sampling for pesticides residues analysis	
	Betel leaf	50% Sampling for *Salmonella* analysis	

Source: Food Safety of Plants and Plant Products Group, Plant Standard and Certification Office



คำสั่งกรมวิชาการเกษตร
ที่ ๑๙๓๙/๒๕๕๗
เรื่อง แต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร

อนุสนธิคำสั่งกรมวิชาการเกษตรที่ ๑๙๓๖/๒๕๕๕ ลงวันที่ ๒๖ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๕ แต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ไว้แล้ว นั้น

เนื่องจากกรมวิชาการเกษตร ได้มีตำแหน่งผู้เชี่ยวชาญ ที่นอกเหนือไปจากคำสั่งเดิม จึงเห็นควรปรับปรุงคำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตรขึ้นใหม่ ฉะนั้น จึงให้ยกเลิกคำสั่งกรมวิชาการเกษตรที่ ๑๙๓๖/๒๕๕๕ ลงวันที่ ๒๖ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๕ เพื่อให้การพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่นของ กรมวิชาการเกษตรแต่ละปีเป็นไปตามระเบียบกรมวิชาการเกษตร จึงแต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตรขึ้นใหม่ โดยมีองค์ประกอบ ดังนี้

๑. อธิบดีกรมวิชาการเกษตร		ที่ปรึกษา
๒. ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช	กรมวิชาการเกษตร	ประธานกรรมการ
๓. ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบการปลูกพืช	กรมวิชาการเกษตร	กรรมการ
๔. ผู้เชี่ยวชาญด้านวิศวกรรมการเกษตร	กรมวิชาการเกษตร	กรรมการ
๕. ผู้เชี่ยวชาญด้านคุ้มครองพันธุ์พืช	สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช	กรรมการ
๖. ผู้เชี่ยวชาญด้านพืชสวน	สถาบันวิจัยพืชสวน	กรรมการ
๗. ผู้เชี่ยวชาญด้านไม้ผล	สถาบันวิจัยพืชสวน	กรรมการ
๘. ผู้เชี่ยวชาญด้านพืชไร่	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน	กรรมการ
๙. ผู้เชี่ยวชาญด้านปรับปรุงพันธุ์พืชไร่	สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน	กรรมการ
๑๐. ผู้เชี่ยวชาญด้านยางพารา	สถาบันวิจัยยาง	กรรมการ
๑๑. ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	กรรมการ
๑๒. ผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	กรรมการ
๑๓. ผู้เชี่ยวชาญด้านวัชพืช	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช	กรรมการ
๑๔. ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรรมการ
๑๕. ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรรมการ
๑๖. ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ	กรรมการ
๑๗. ผู้เชี่ยวชาญด้านกักกันพืช	สำนักควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร	กรรมการ
๑๘. ผู้เชี่ยวชาญด้านควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	กรรมการ
๑๙. ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบควบคุมการนำเข้าส่งออกสินค้าพืชและปัจจัยการผลิต	สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	กรรมการ

๒๐. ผู้เชี่ยวชาญ...

๒๐. ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์และทดสอบ	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร	กรรมการ
๒๑. ผู้เชี่ยวชาญด้านดินและปุ๋ย	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร	กรรมการ
๒๒. ผู้เชี่ยวชาญด้านวัตถุอันตรายทางการเกษตร	สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร	กรรมการ
๒๓. ผู้เชี่ยวชาญด้านวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว	สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร	กรรมการ
๒๔. ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์เกษตร	สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร	กรรมการ
๒๕. ผู้เชี่ยวชาญด้านมาตรฐานคุณภาพสินค้าเกษตร	สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร	กรรมการ
๒๖. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคเหนือตอนบน) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๑ จังหวัดเชียงใหม่		กรรมการ
๒๗. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคเหนือตอนล่าง) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๒ จังหวัดพิษณุโลก		กรรมการ
๒๘. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๓ จังหวัดขอนแก่น		กรรมการ
๒๙. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๔ จังหวัดอุบลราชธานี		กรรมการ
๓๐. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคกลาง) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๕ จังหวัดชัยนาท		กรรมการ
๓๑. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคตะวันออก) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๖ จังหวัดจันทบุรี		กรรมการ
๓๒. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคใต้ตอนบน) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๗ จังหวัดสุราษฎร์ธานี		กรรมการ
๓๓. ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการผลิตพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ (ภาคใต้ตอนล่าง) สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๘ จังหวัดสงขลา		กรรมการ

๓๔. ผู้อำนวยการ...

๓๔. ผู้อำนวยการกองแผนงานและวิชาการ กรรมการและเลขานุการ
กองแผนงานและวิชาการ

๓๕. ผู้อำนวยการกลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กรรมการและผู้ช่วยเลขานุการ
กองแผนงานและวิชาการ

โดยให้คณะกรรมการชุดนี้มีอำนาจหน้าที่ดังนี้

๑. ดำเนินการพิจารณาคัดเลือกผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร

๒. ตรวจสอบความสมบูรณ์ผลงานวิจัยดีเด่นให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ

๓. แต่งตั้งคณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร แต่ละประเภท

๔. เชิญผู้ทรงคุณวุฒิที่เกี่ยวข้องเข้าร่วมพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๒๑ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๕๗

(นายอนันต์ สุวรรณรัตน์)
อธิบดีกรมวิชาการเกษตร



คำสั่งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร
ที่ ๒ /๒๕๕๗
เรื่อง แต่งตั้งคณะอนุกรรมการพิจารณางานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี ๒๕๕๗

ตามคำสั่งกรมวิชาการเกษตร ที่ ๑๙๓๙/๒๕๕๗ สั่ง ณ วันที่ ๒๑ พฤศจิกายน พ.ศ. ๒๕๕๗ แต่งตั้งคณะกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร เพื่อพิจารณาและคัดเลือกผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี ๒๕๕๗ ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งจำแนกงานประเภทงานวิจัยไว้จำนวน ๖ ประเภท นั้น เพื่อให้การพิจารณาคัดเลือกผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี ๒๕๕๗ เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โปร่งใส บริสุทธิ์ ยุติธรรม จึงเห็นสมควรแต่งตั้งคณะอนุกรรมการพิจารณางานวิจัยดีเด่น ประจำปี ๒๕๕๗ เพื่อทำหน้าที่พิจารณาผลงานวิจัยแต่ละประเภท ดังนี้

๑. คณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน ประกอบด้วย

๑.๑	ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช		ที่ปรึกษาคณะอนุกรรมการ
๑.๒	ผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช		ประธานคณะอนุกรรมการ
๑.๓	ผู้เชี่ยวชาญด้านดินและปุ๋ย		อนุกรรมการ
๑.๔	ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์เกษตร		อนุกรรมการ
๑.๕	ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช		อนุกรรมการ
๑.๖	ผู้เชี่ยวชาญด้านอนุรักษ์พันธุกรรม		อนุกรรมการ
๑.๗	ผู้เชี่ยวชาญด้านคุ้มครองพันธุ์พืช		อนุกรรมการ
๑.๘	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน		อนุกรรมการ
๑.๙	นางสาวณัฏฐิณี ศิริมาจันทร์	กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ	เลขานุการ

๒. คณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทงานวิจัยประยุกต์ ประกอบด้วย

๒.๑	ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช		ที่ปรึกษาคณะอนุกรรมการ
๒.๒	ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์เกษตร		ประธานคณะอนุกรรมการ
๒.๓	ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบปลูกพืช		อนุกรรมการ
๒.๔	ผู้เชี่ยวชาญด้านไม้ผล		อนุกรรมการ
๒.๕	ผู้เชี่ยวชาญด้านวัชพืช		อนุกรรมการ
๒.๖	ผู้เชี่ยวชาญด้านปรับปรุงพันธุ์พืชไร่		อนุกรรมการ
๒.๗	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคเหนือตอนบน		อนุกรรมการ
๒.๘	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคกลาง		อนุกรรมการ
๒.๙	นายโกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล	กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ	เลขานุการ

/๓. คณะอนุกรรมการ...

๓. คณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทปรับปรุงพันธุ์ ประกอบด้วย

๓.๑	ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช	ที่ปรึกษาคณะอนุกรรมการ
๓.๒	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคใต้ตอนบน	ประธานคณะอนุกรรมการ
๓.๓	ผู้เชี่ยวชาญด้านดินและปุ๋ย	อนุกรรมการ
๓.๔	ผู้เชี่ยวชาญด้านโรคพืช	อนุกรรมการ
๓.๕	ผู้เชี่ยวชาญด้านปรับปรุงพันธุ์พืชไร่	อนุกรรมการ
๓.๖	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคเหนือตอนบน	อนุกรรมการ
๓.๗	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง	อนุกรรมการ
๓.๘	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคตะวันออก	อนุกรรมการ
๓.๙	นายธีรเดช เกลียวกลม กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ	เลขานุการ

๔. คณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทงานวิจัยพัฒนางานวิจัย ประกอบด้วย

๔.๑	ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช	ที่ปรึกษาคณะอนุกรรมการ
๔.๒	ผู้เชี่ยวชาญด้านพืชไร่	ประธานคณะอนุกรรมการ
๔.๓	ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบปลูกพืช	อนุกรรมการ
๔.๔	ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา	อนุกรรมการ
๔.๕	ผู้เชี่ยวชาญด้านยางพารา	อนุกรรมการ
๔.๖	ผู้เชี่ยวชาญด้านกักกันพืช	อนุกรรมการ
๔.๗	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง	อนุกรรมการ
๔.๘	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคใต้ตอนล่าง	อนุกรรมการ
๔.๙	นางสาวกัญญ์ดา ยิ่งภิญโญ กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ	เลขานุการ

๕. คณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทงานวิจัยสิ่งประดิษฐ์คิดค้น ประกอบด้วย

๕.๑	ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช	ที่ปรึกษาคณะอนุกรรมการ
๕.๒	ผู้เชี่ยวชาญด้านการควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร	ประธานคณะอนุกรรมการ
๕.๓	ผู้เชี่ยวชาญด้านวัชพืช	อนุกรรมการ
๕.๔	ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร	อนุกรรมการ
๕.๕	ผู้เชี่ยวชาญด้านวิศวกรรมการเกษตร	อนุกรรมการ
๕.๖	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคตะวันออก	อนุกรรมการ
๕.๗	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคใต้ตอนบน	อนุกรรมการ
๕.๘	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง	อนุกรรมการ
๕.๙	นางสาวหนึ่งฤทัย ศรีธรราษฎร์ กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ	เลขานุการ

/๖. คณะอนุกรรมการ...

๖. คณะอนุกรรมการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประเภทงานบริการวิชาการ ประกอบด้วย

๖.๑	ผู้เชี่ยวชาญด้านการผลิตพืช	ที่ปรึกษาคณะอนุกรรมการ
๖.๒	ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร	ประธานคณะอนุกรรมการ
๖.๓	ผู้เชี่ยวชาญด้านศัตรูพืช	อนุกรรมการ
๖.๔	ผู้เชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา	อนุกรรมการ
๖.๕	ผู้เชี่ยวชาญด้านระบบควบคุมการนำเข้าส่งออกสินค้าพืชและปัจจัยการผลิต	อนุกรรมการ
๖.๖	ผู้เชี่ยวชาญด้านวัตถุอันตรายทางการเกษตร	อนุกรรมการ
๖.๗	ผู้เชี่ยวชาญด้านวิเคราะห์และทดสอบ	อนุกรรมการ
๖.๘	ผู้เชี่ยวชาญด้านการจัดการพืชที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน	อนุกรรมการ
๖.๙	นายธีรเดช เกลียวกลม กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ	เลขานุการ

โดยให้อนุกรรมการฯ แต่ละคณะมีอำนาจหน้าที่ดังนี้

๑. ดำเนินการพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่นแต่ละประเภทอย่างโปร่งใส บริสุทธิ์ ยุติธรรม

๒. ตรวจสอบความสมบูรณ์ผลงานวิจัยดีเด่นให้ถูกต้องตามหลักวิชาการ

ทั้งนี้ให้คณะอนุกรรมการฯ แต่ละคณะพิจารณาผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี ๒๕๕๗ ให้แล้วเสร็จ และนำผลการพิจารณาเสนอต่อคณะกรรมการพิจารณางานวิจัยดีเด่นภายในระยะเวลาที่คณะกรรมการฯ กำหนด และการประชุมของอนุกรรมการฯ เพื่อพิจารณาคัดเลือกผลงานวิจัยดีเด่นแต่ละประเภทต้องมีองค์ประชุมอนุกรรมการไม่น้อยกว่า ๕ ท่าน

สั่ง ณ วันที่ ๑๙ ธันวาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

(นายทรงพล สมศรี)
นักวิชาการเกษตรเชี่ยวชาญ
รักษาราชการแทนหัวหน้าคณะผู้เชี่ยวชาญ

รายชื่องานวิจัยที่หน่วยงานเสนอเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

	ชื่อเรื่อง	หน่วยงาน
ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน		
1	วิธีการประเมินการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนสในมะม่วงโดยการตรวจสอบการเข้าทำลายแฝง (Quiescent infection)	สวป.
2	พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*	สอพ.
3	ศึกษาการตอบสนองของมันสำปะหลังต่อการจัดการธาตุอาหารในดินเหนียว ชุดดินโชคชัย	สปผ.
4	โมเลกุลเครื่องหมายในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบปาล์มน้ำมันลูกผสมชนิดเทเนอรา	สทช.
5	คัดเลือกชนิดสาหร่ายขนาดเล็กที่เหมาะสมกับการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคชีวโมเลกุล	สทช.
6	การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกระเทียมจากแหล่งปลูกต่าง ๆ	สวส.
ประเภทงานวิจัยประยุกต์		
1	การสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับดาหลาในเชิงพาณิชย์ด้วยการสกัดเส้นใยจากลำต้นดาหลาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการทอผ้า ในจังหวัดนราธิวาส	สวพ.8
2	การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตและการแปรรูปส้มจี๊ดในพื้นที่ภาคตะวันออก	สวพ.6
3	สารชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกแอซิด	สวป.
4	การใช้เทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* สาเหตุโรคแคงเคอร์ เพื่อการตรวจรับรองแปลงผลิตส้มโอปลอดโรคแคงเคอร์	สอพ.
5	ความต้องการน้ำและค่าสัมประสิทธิ์การใช้น้ำของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3	สวร.
6	วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์	สวร.
7	การวิจัยและพัฒนาระบบกรีดที่เหมาะสมกับยางพันธุ์ RRIT 251 ในเขตพื้นที่ภาคใต้ตอนบน	สวพ.7
ประเภทงานปรับปรุงพันธุ์		
1	ข้าวฟ่างพันธุ์ "สุพรรณบุรี 2"	สวพ.5
ประเภทงานพัฒนางานวิจัย		
1	การใช้สารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกหวานหลังการเก็บเกี่ยว	สวป.
2	การพัฒนาเทคนิคการใช้สารแบบผสมผสานเพื่อแก้ไขปัญหาหนอนหัวดำมะพร้าว ; *Opisina arenosella* และแมลงดำหนามมะพร้าว ; *Brontispa longissima*	สอพ.

3	ศึกษาการให้น้ำอย่างเหมาะสมสำหรับการผลิตข้าวโพดหวานในดินเหนียว ชุดดินทับกวาง	สปผ.
4	การเพิ่มศักยภาพการผลิตห้อมเพื่อใช้ย้อมผ้าในภาคเหนือตอนบน	สวพ.1
5	การพัฒนาเทคโนโลยีผลิตหอมแดงคุณภาพ	สวพ.4
6	ทดสอบระบบการปลูกพืชในพื้นที่ชลประทานโครงการสูบน้ำด้วยไฟฟ้าทุ่งวัดสิงห์ จังหวัดชัยนาท	สวพ.5
7	การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากถั่วเขียวในระดับอุตสาหกรรมครัวเรือน	สวร.
8	การวิจัยและพัมนาเทคโนโลยีการผลิตส้มโอพันธุ์ทับทิมสยามในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน	สวพ.7
9	การผลิตกรดแลคติกจากมันเทศ	สวส.
10	เทคโนโลยีการแปรรูปผลิตภัณฑ์ชาเพื่อผลิตชาเขียวชนิดอบไอน้ำ และชาฝรั่ง	สวส.
ประเภทงานสิ่งประดิษฐ์คิดค้น		
1	การเตรียมฟิล์มชีวภาพจากแป้งของพืชที่มีศักยภาพ	สวป.
2	วิจัยและพัฒนาไถระเบิดดินดานสำหรับรถแทรคเตอร์ขนาดกลาง	สวศ.
3	การทดสอบพัฒนาเครื่องอบแห้งลมร้อนแบบชั้นวางร่วมกับโรงอบแห้งพลังงานแสงอาทิตย์สำหรับผลิตพริกอินทรีย์คุณภาพในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี	สวศ.
4	วิจัยและพัมนาอุปกรณ์ให้ปุ๋ยพร้อมระบบน้ำหยดสำหรับการปลูกพืชโดยใช้พลาสติกคลุม	สวศ.
ประเภทงานบริการวิชาการ		
1	มาตรการควบคุมพิเศษการส่งออกผักและผลไม้สดไปสหภาพยุโรป นอเวย์ และสมาพันธรัฐสวิสระบบบัญชีรายชื่อโรงคัดบรรจุ	สมพ.
2	ห้องปฏิบัติการเครือข่ายมาตรฐาน ISO/IEC 17025:2005 ในส่วนภูมิภาคเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งและมั่นคงทางการเกษตรก้าวสู่ผู้นำ AEC	สวพ.2
3	การใช้สารสกัดพืชและจุลินทรีย์เพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* ในการผลิตผักสด	สวป.
4	โครงการตรวจสอบและรับรองสุขอนามัยพืชสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อส่งออกในฤดูผลิตปี 2555/56-2556/57	สอพ.
5	โครงการการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตมันสำปะหลังในเขตจังหวัดลพบุรีและสระบุรี	สวพ.5
6	หมู่บ้านเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมนครสวรรค์ 3	สวร.
7	การพัฒนาการผลิตและส่งออกไม้ผลเศรษฐกิจในพื้นที่ภาคใต้ตอนบน	สวพ.7

คณะผู้จัดทำผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

ที่ปรึกษา

อนันต์ สุวรรณรัตน์	อธิบดีกรมวิชาการเกษตร
สุวิทย์ ชัยเกียรติยศ	รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร
ดิเรก ตนพยอม	รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร
เสริมสุข สลักเพ็ชร์	รองอธิบดีกรมวิชาการเกษตร
อนันต์ อักษรศรี	ผู้อำนวยการกองแผนงานและวิชาการ

ข้อมูล

คณะผู้วิจัย และบุคลากรหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร

กองบรรณาธิการ

คณะอนุกรรมการพิจารณางานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557

คณะผู้เรียบเรียง

กลุ่มวิเคราะห์การใช้ประโยชน์ผลงานวิจัย กองแผนงานและวิชาการ

โกมินทร์ วิโรจน์วัฒนกุล	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
หนึ่งฤทัย ศรีธรราษฎร์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
กัญญ์ดา ยิ่งภิญโญ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
ณัฏฐิณี ศิริมาจันทร์	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
ธีรเดช เกลียวกลม	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ
นิยม รอดทิม	นักวิชาการเกษตร
วรินดา เม่นทอง	นักวิชาการเกษตร
ศิรินทิพย์ พิลาเดช	นักวิชาการเกษตร
จีรวรรณ พรหมตัน	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์นโยบายและแผน
สมเจตน์ บุรีรักษ์	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์นโยบายและแผน
ธนพนธ์ เผ่าบรรจง	เจ้าหน้าที่ระบบงานคอมพิวเตอร์

กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร

50 พหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทรศัพท์ 0-2579-1306, 0-2940-5411 โทรสาร 0-2940-6342