



วารสารเกษตร

JOURNAL OF AGRICULTURE

วารสารวิชาการของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 กุมภาพันธ์ 2550

ผลของการห่อช่องผลที่มีต่อการเติบโตและการสุกของผลลิ้นจี่พันธุ์สงขลวย

วุดิเดช บุรีรักษ์ และ พัทธยา สรวมศิริ.....1

ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์ร่วมกับพาโคลบิวทราโซลที่มีต่อการออกดอกของลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิ

วัชรพล สิงหกัน และ ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข.....11

การปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ของพริกเผ็ดโดยใช้ลักษณะเกษตรเพศผู้เป็นหมัน

จุฑามาส คุ่มชัย และ มณีฉัตร นิกรพันธุ์.....17

การเพิ่มความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานโดยใช้กรดแอบไซซิก

ปิยชัย เปรมวรานนท์ สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์ และ สุชาดา เวียรศิลป์.....25

การพัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน

สุชาดา เวียรศิลป์ ปิยชัย เปรมวรานนท์ และ สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์.....31

การวิเคราะห์พันธุกรรมของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยเทคนิค RAPD-PCR

จารุวรรณ จันทรา จิราพร ตยุดิวิกุล อังสนา อัครพิศาล ทิพรณี เสนะวงศ์
และ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ.....39

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการควบคุมโรคยอดผักดาบของข้าวในระยะต้นกล้า

สายชล ไนชัย และ สมบัติ ศรีขวงค์.....49

ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในการควบคุมโรคยอดผักดาบในต้นกล้าข้าว

สายชล ไนชัย และ สมบัติ ศรีขวงค์.....59

ผลของการอบรมเชิงบรรยายต่อความรู้และความตระหนักเกี่ยวกับการควบคุมโดยชีววิธีด้วยไรโซ

แบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชของเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย

กัญชลี เจตยานนท์ ภิญญภา เปลี่ยนบางช้าง และ ปิยะรัตน์ นิมพิทักษ์พงศ์.....67

การจำแนกยีนที่ด้านทานเชื้อ Escherichia coli ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านม
โดยใช้เทคนิค DDRT-PCR

จิรพิพรรธ แพรไพศาล ศุภมิตร เมฆฉาย และ พัทธินทร์ ครุฑเมือง.....79

คำแนะนำในการเตรียมต้นฉบับ

เรื่องที่ตีพิมพ์

บทความวิจัย บทความปริทัศน์ หรือบทความวิชาการ

การเตรียมต้นฉบับ

1. ภาษา เป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ

2. การพิมพ์ พิมพ์หน้าเดียวบนกระดาษขนาด A 4 ด้วยไมโครคอมพิวเตอร์โปรแกรมไมโครซอฟท์เวิร์ด ตัวอักษร Cordia new ขนาด 14 ตัวอักษรต่อหน้า ความยาวไม่ควรเกิน 10 หน้า (รวมบทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ)

3. การเรียงลำดับเนื้อหา

3.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรสั้น ชัดเจน และต้องสื่อเป้าหมายหลักของการศึกษาวิจัย ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

3.2 ชื่อผู้เขียนและที่อยู่ เป็นภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

3.3 บทคัดย่อ (Abstract) ควรเป็นเนื้อหาที่สั้น ชัดเจนและเข้าใจง่าย โดยรวมเหตุผลในการศึกษาวิจัย อุปกรณ์ วิธีการ ตลอดจนผลการศึกษาและสรุปด้วย ทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ ไม่ควรเกิน 200 คำ และให้ระบุคำสำคัญ (keywords) ไว้ท้ายบทคัดย่อแต่ละภาษาด้วย (บทความปริทัศน์อาจไม่ต้องมีบทคัดย่อ)

3.4 คำนำ (Introduction) แสดงความเป็นมาและเหตุผลที่นำไปสู่การศึกษาวิจัย อาจรวมการทบทวนเอกสาร (Review of Literature) และวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยไว้ด้วย

3.5 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) ให้อธิบายละเอียดวัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ ตลอดจนวิธีและแบบจำลองการศึกษาวิจัยที่ชัดเจน และสมบูรณ์

3.6 ผลการศึกษา (Results) ให้นำบรรยายผลการศึกษาวิจัย พร้อมเสนอข้อมูลในรูปแบบตารางหรือภาพประกอบได้ โดยตารางหรือภาพ ให้จัดทำเป็นภาษาอังกฤษทั้งหมด

3.7 วิจารณ์ (Discussion) ควรเชื่อมโยงกับผลการศึกษาว่าสอดคล้องกับสมมุติฐาน หรือแตกต่างไปจากผลงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหรือไม่อย่างไรและด้วยเหตุใด โดยมีพื้นฐานการอ้างอิงที่เชื่อถือได้ วิจารณ์อาจนำไปรวมกับผลการศึกษาเป็นผลการศึกษาและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.8 สรุป (Conclusion) ควรสรุปผลที่ได้รับจากการศึกษาวิจัยว่าเป็นไปตามวัตถุประสงค์หรือไม่ พร้อมให้ข้อเสนอแนะ หรือระบุอุปสรรคและแผนงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไป

4. กิตติกรรมประกาศ หรือ คำขอบคุณ (Acknowledgement)

อาจมีหรือไม่ก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ที่ช่วยเหลือในงานวิจัย แต่ไม่ได้เป็นผู้ร่วมงานวิจัย

5. เอกสารอ้างอิง (References)

5.1 ในเนื้อเรื่อง ไม่ควรอ้างอิงถึงเรื่องที่ไม่ว่าเกี่ยวข้องกับหรือห่างไกล ระบบที่ใช้อ้างอิงคือ ระบบชื่อ และปี (Name-and-year System) ในเอกสารภาษาไทย ให้ใช้ชื่อตัวและปี พ.ศ. เช่น สมชาย (2545) รายงานว่า...หรือ...(สมชาย, 2545) หากมีผู้เขียน 2 คน ให้ใช้ชื่อเป็น สมชาย และสมหญิง (2547) รายงานว่า...หรือ...(สมชาย และสมหญิง, 2547) และถ้ามีผู้เขียนตั้งแต่ 3 คนขึ้นไป ให้ใช้ชื่อคนแรกแล้วตามด้วยคำว่า และคณะ เช่น สมชาย และคณะ (2546) รายงานว่า...หรือ...(สมชาย และคณะ, 2546) ในกรณีเอกสารเป็นภาษาอังกฤษ ให้ใช้ชื่อสกุลและปี ค.ศ. เช่น Johny, (2003)...หรือ...(Johny, 2003) ถ้าผู้เขียนมี 2 คน ให้ใช้ชื่อ Johny and Walker (2004)...หรือ...(Johny and Walker, 2004) หากมีมากกว่า 3 คน ให้ใช้ชื่อ Johny *et al.* (2005)...หรือ...(Johny *et al.*, 2005) สำหรับในบัญชีเอกสารอ้างอิง ให้ใส่ชื่อผู้เขียนทุกคนห้ามใช้คำว่า และคณะ หรือ *et al.*

5.2 ในบัญชีเอกสารอ้างอิง ให้เรียงลำดับเอกสารภาษาไทยก่อนภาษาอังกฤษโดยเรียงตามลำดับอักษรในแต่ละภาษา ตามรูปแบบการเขียนมีดังนี้

1) วารสาร (Journals)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ชื่อวารสาร (เขียนเต็มหรือย่อก็ได้) ปีที่(ฉบับที่): เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด.

วันทนา มุทิตา และ ญัฐา ควรประเสริฐ. 2547. เซลล์พันธุศาสตร์และการถ่ายทอดลักษณะของฟิวเซีย. ว. เกษตร 20(1): 10-18.

Barceñas, N.M., T.R. Unruh and L.G. Neven. 2005. DNA diagnostics to identify internal feeders (Lepidoptera: Tortricidae) of pome fruits of quarantine importance. J. Econ. Entomol. 98(2): 299-306.

2) หนังสือ และตำรา (Books & Textbooks)

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์. เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

จริยา วิสิทธิ์พานิช ชาศรี สิทธิกุล และ ยาวลักษณ์ จันทร์บาง. 2545. โรคและแมลงศัตรูลำไย ลิ้นจี่ และมะม่วง. สมรรถนการพิมพ์, เชียงใหม่. 308 หน้า.

Gullan, P.J. and P.S. Cranston. 2005. The Insects: An Outline of Entomology. 3rd ed. Blackwell Publishing, Malden. 505 pp.

3) เรื่องย่อยในตำราหรือหนังสือที่มีผู้เขียนแยกเรื่องกันเขียน และมีบรรณานุกรม

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องย่อย. หน้า เลขหน้าเริ่มต้น-เลขหน้าที่สิ้นสุด. ใน:

ชื่อบรรณาธิการ, (บก.). ชื่อหนังสือ. สำนักพิมพ์, เมืองที่พิมพ์.

ดำรง เวชกิจ และ สมบูรณ์ ทองสกุล. 2535. เทคนิคการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช. หน้า 22-42. ใน: สุวัฒน์ วยยจริย, (บก.). แมลงและศัตรูศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ไอเดียสแควร์, กรุงเทพฯ.

Kubo, T. 2003. Molecular analysis of the honeybee sociality, pp. 3-20. In: T. Kikuchi, N. Azuma and S. Higashi, (eds.). Gene, Behaviors and Evolution of Social Insects. Hokkaido University Press, Sapporo.

4) วิทยานิพนธ์

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. ระดับวิทยานิพนธ์. สถาบันการศึกษา. เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

อภิรักษ์ มณีพองษ์. 2547. ผลของการใช้อินทรีย์วัตถุคุณภาพและสารพิษตกค้างหลังการเก็บเกี่ยวส้มพันธุ์สายน้ำผึ้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 100 หน้า.

5) เอกสารวิชาการอื่นๆ

ชื่อผู้เขียน หรือหน่วยงาน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่องหรือชื่อหนังสือ. ประเภทของเอกสาร. สถาบันหรือหน่วยงานที่จัดพิมพ์, เมืองที่พิมพ์. จำนวนหน้าทั้งหมด.

ทวีศักดิ์ ชัยภาส. 2544. แมลงศัตรูปลาน้ำจืดในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 126 หน้า.

6) สื่ออิเล็กทรอนิกส์

ชื่อผู้เขียน. ปีที่พิมพ์. ชื่อเรื่อง. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: ชื่อWebsite (วันเดือนปีที่สืบค้นข้อมูล).

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2548. การปลูกผักแบบไม่ใช้ดิน (ไฮโดรโปนิกส์). (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.doe.go.th/proster/nondin/html> (21 เมษายน 2548)

Linardakis, D.K. and B.I. Manolis. 2005. Hydroponic culture of strawberries in perfitte. (Online). Available: <http://www.schundler.com/strawberries.htm> (April 21, 2005)

การส่งเรื่องเพื่อตีพิมพ์

ให้ส่งต้นฉบับ 1 ชุด พร้อมแผ่นบันทึกข้อมูล โดยส่งถึง บรรณารักษารวบรวมเอกสาร งานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

วารสารเกษตร

JOURNAL OF AGRICULTURE

ผู้จัดพิมพ์	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	Publisher	Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
กำหนดการพิมพ์	วารสารราย 4 เดือน (3 ฉบับ/ปี)	Publication	Tri-annually
วัตถุประสงค์	เพื่อเผยแพร่วิทยาการด้านการเกษตร และสาขาที่เกี่ยวข้อง	Objective	To disseminate academic knowledge in agriculture and related fields
ที่ปรึกษา	คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ รองคณบดีฝ่ายวิจัย รองคณบดีฝ่ายบริการวิชาการและ ถ่ายทอดเทคโนโลยี รศ. นคร ณ ลำปาง ผศ. ดร. มนุ ศีตีสาร รศ. ดร. พิทยา สรวมศิริ รศ. ไพฑูรย์ รอดวินิจ รศ. ดร. บุญล้อม ชีวะอิสระกุล รศ. ดร. ไสว บุรณพานิชพันธุ์ รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ รศ. ศุภศักดิ์ ลิ้มปิติ ผศ. วราภา คุณาพร รศ. ถนอม คลอดเพ็ง รศ. ดร. ธวัชชัย รัตนซ์เลศ	Consultant	Dean, Faculty of Agriculture Associate Dean for Research Affairs Associate Dean for Community Affairs and Technology Transfer Nakom Nalampang, Assoc. Prof. Manu Seetisarn, Ph.D., Assis. Prof. Pittaya Sruamsiri, Dr. Agr., Assoc. Prof. Paitoon Rodvinij, Assoc. Prof. Boonlom Cheva-Isarakul, Dr. Agr, Assoc. Prof. Sawai Buranapanichpan, Ph.D., Assoc. Prof. Sombat Srichuwong, Ph.D., Assoc. Prof. Supasark Limpiti, Assoc. Prof. Warapa Kunaporn, Assist Prof. Thanom Klodpeng, Assoc. Prof. Tavatchai Radanachaless, Dr. Agr., Assoc. Prof.
บรรณาธิการ	รศ. ไพฑูรย์ รอดวินิจ	Editor	Paitoon Rodvinij, Assoc. Prof.
กองบรรณาธิการ	รศ. ดร. บุญล้อม ชีวะอิสระกุล รศ. ดร. ไสว บุรณพานิชพันธุ์ รศ. ดร. สมบัติ ศรีชูวงศ์ รศ. ศุภศักดิ์ ลิ้มปิติ ผศ. วราภา คุณาพร รศ. ถนอม คลอดเพ็ง รศ. ดร. ธวัชชัย รัตนซ์เลศ	Editorial Board	Boonlom Cheva-Isarakul, Dr. Agr, Assoc. Prof. Sawai Buranapanichpan, Ph.D., Assoc. Prof. Sombat Srichuwong, Ph.D., Assoc. Prof. Supasark Limpiti, Assoc. Prof. Warapa Kunaporn, Assist Prof. Thanom Klodpeng, Assoc. Prof. Tavatchai Radanachaless, Dr. Agr., Assoc. Prof.
เลขานุการ	นางสาววิไลพร ธรรมตา	Secretary	Vilaporn Thammata
สำนักงานและ การติดต่อ	กองบรรณาธิการวารสารเกษตร งานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200 โทร. 0 5394 4089-92 ต่อ 11 โทรสาร 0 5394 4666 E-mail: agjournal@chiangmai.ac.th	Office and Inquiries	Editorial Board, Journal of Agriculture, Research and International Relations, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand Tel: 0 5394 4089-92 Fax: 0 5394 4666 E-mail: agjournal@chiangmai.ac.th
การบอกรับ เป็นสมาชิก	บอกรับเป็นสมาชิกได้จากใบบอก รับเป็นสมาชิกที่ได้แนกมาพร้อมนี้ หรือติดต่อกองบรรณาธิการโดยตรง	Membership	Apply through the membership form as attached herewith or contact directly to the Editorial Board

กองบรรณาธิการขอสงวนสิทธิ์ในการตรวจและแก้ไข
บทความที่เสนอเพื่อการตีพิมพ์ในวารสารเกษตร

The Editorial Board claims a right to review and
correct all articles submitted for publishing

ผลของการห่อหุ้มผลที่มีต่อการเติบโตและการสุกของ ผลลั่นจีพันธุ์ฮงฮวย

Effect of Bagging on Growth and Ripening of Litchi Fruit cv. Hong Huay

วุฒิเดช บุรีรักษ์^{1/} และ พิทยา สรวมศิริ^{1/}
Wuthidech Bureerak^{1/} and Pittaya Srumsiri^{1/}

Abstract: The experiment was conducted based on factorial (2x5) in CRD comprising 2 factors. The first factor was the fruit age after fruit set (1 and 2 months) and the second one was the bagging material (newspaper bag, remay bag, carbon bag and transparent plastic bag). The study was carried out at farmer's litchi plot on highland of Mae-Rim district, Chiang Mai by random the 'Hong Huay' litchi's fruit clusters (with average 20 fruits/cluster) at 1 and 2 months after fruit set. Total of 10 clusters (replications) per treatment were then bagged by studies material. Fruits were harvested at the time that control fruit ripened. The result revealed that bagging at two months fruit age significantly reduced the number of fruit drop, i.e. the remay bag and carbon bag. The remay bag could also solve the problem of fruit browning and fruit cracking. The red color of fruit peel was however the best by using the transparent plastic bag and remay bag. All fruit ages and bag types had no effect on fruit size and fruit ripening, which indicated by total soluble solid (TSS) and total titratable acid (TA).

Keywords: Litchi, fruit, bagging, Hong Huay

บทคัดย่อ: วางแผนการทดลองแบบ Factorial (2x5) in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยของอายุผล (1 และ 2 เดือน หลังติดผล) และปัจจัยของชนิดถุงที่ใช้ห่อผล (ถุงกระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงห่อผลไม้สีขาว, ถุงคาร์บอนสีน้ำตาล และ ถุงพลาสติกใส) ทำการทดลองที่สวนลั่นจีของเกษตรกรบนที่สูง บริเวณอำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ เริ่มทำการทดลองโดย สุ่มเลือกห่อผลลั่นจีพันธุ์ฮงฮวยที่มีอายุหลังติดผล 1 และ 2 เดือน ซึ่งมีจำนวนผลต่อห่อประมาณ 20 ผล กรรมวิธีละ 10 ห่อ (ซ้ำ) จากนั้นทำการห่อหุ้มผลด้วยถุงชนิดต่าง ๆ และทำการเก็บเกี่ยวเมื่อผลในกรรมวิธีควบคุมสุก ผลการทดลองพบว่า การห่อหุ้มผลในช่วงอายุผล 2 เดือน สามารถลดการหลุดร่วงของผลได้ดีที่สุด โดยเฉพาะการห่อด้วยถุงห่อผลไม้สีขาว และถุง

^{1/}ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำตาล ส่วนลักษณะภายนอกของผล พบว่าการห่อหุ้มผลด้วยถุงห่อผลไม้สีขาว มีเปอร์เซ็นต์จำนวนผลที่มีลักษณะดี คือเปลือกผลไม่เป็นสีน้ำตาล ผลไม่แตกหรือเน่าเสียสูงที่สุด ทางด้านสีของเปลือก พบว่าการห่อหุ้มผลด้วยถุงพลาสติกใส และถุงห่อผลไม้สีขาว สามารถช่วยให้เปลือกผลเมื่อถึงระยะเก็บเกี่ยวมีสีแดงที่สุด ส่วนผลของระยะเวลาในการห่อหุ้ม และวัสดุที่ใช้ห่อ ต่อปริมาณของผลแต่ละเกรดภายในห่อและการสุกของผล ซึ่งพิจารณาจากปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) ของเนื้อ พบว่าทุกกรรมวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ: ลิ้นจี่, ผล, การห่อหุ้ม, ฮงฮวย

คำนำ

ปัจจุบันผลผลิตลิ้นจี่ในท้องตลาดมีราคาค่อนข้างต่ำ อันเนื่องมาจากสาเหตุสำคัญหลายประการ เช่น คุณภาพผลผลิตไม่ได้มาตรฐานตามความต้องการของตลาด ทั้งสีผิวที่คล้ำ ขนาดผลเล็ก หรือเป็นโรค อีกทั้งการที่ผลผลิตออกสู่ตลาดพร้อมกันเป็นจำนวนมาก ทำให้ราคาถูกดึงลงมาสู่ระดับต่ำ ซึ่งในส่วนของ การปรับปรุงคุณภาพผลผลิตนั้น เกษตรกรไทยยังนิยมใช้สารเคมีเป็นส่วนใหญ่ ส่วนการห่อหุ้ม เป็นเทคนิคที่มีการนำมาใช้กับผลไม้หลายชนิด เช่น ฝรั่ง ชมพู และมะม่วง เป็นต้น เพื่อป้องกันความเสียหายของผลจากโรคและแมลงศัตรูพืช ซึ่งวัสดุที่ใช้ห่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการห่อหุ้ม นั้น ก็แตกต่างกันไปตามชนิดของพืช เช่น การห่อหุ้มผลลำไยด้วยถุงกระดาษสีน้ำตาล พบว่าทำให้มีค่าความสว่างของสีผิวมากที่สุด (ธีรบุษ และคณะ, 2545) และในลิ้นจี่ พบว่าการใช้ถุงพลาสติกใสเปิดปลายถุงในการห่อ สามารถทำให้ขนาดผลและสีผิวเปลือกของผลที่มีการห่อมีความสม่ำเสมอมาก และยังมีขนาดผลที่ใหญ่กว่าการไม่ห่อหุ้มผลอีกด้วย (รวี, 2540) การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มุ่งศึกษาถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการห่อหุ้มผล วัสดุที่ใช้ห่อ ผลกระทบต่อคุณภาพผลผลิตและระยะเวลาการสุกแก่ของผล เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพผลของลิ้นจี่พันธุ์ฮงฮวยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial (2x5) in CRD ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยของอายุผล (1 และ 2 เดือนหลังติดผล) และปัจจัยของวัสดุที่ใช้ห่อหุ้ม (ถุงกระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงห่อผลไม้สีขาว, ถุงคาร์บอน

ไดออกไซด์ และถุงพลาสติกใส) เริ่มทำการทดลองโดย สุ่มเลือกห่อหุ้มลิ้นจี่ที่มีอายุหลังติดผล 1 และ 2 เดือน ซึ่งมีจำนวนผลต่อห่อประมาณ 20 ผล และมีขนาดผลใกล้เคียงกัน กรรมวิธีละ 10 ห่อ ทำการห่อหุ้มด้วยวัสดุต่าง ๆ บันทึกข้อมูลหลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อผลในกรรมวิธีครบคลุมสุก (วันที่ 11 พฤษภาคม 2548) โดยทำการนับจำนวนผลต่อห่อในระยะเก็บเกี่ยว คัดขนาด และนับจำนวนผลแต่ละขนาด สีผิวเปลือก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (TA) ของเนื้อ

ผลการทดลอง

เมื่อนำผลผลิตมาจำแนกคุณภาพของผล พบว่า ในส่วนของจำนวนผลที่หลุดภายในห่อ และขนาดของผล ที่ระยะเก็บเกี่ยวนั้น พบว่า ผลของปัจจัยทั้ง 2 ต่อจำนวนผลในห่อมี interaction ซึ่งกันและกัน โดยที่การห่อหุ้มผลด้วยถุงคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระยะอายุผล 2 เดือน มีแนวโน้มที่ดีในการรักษาจำนวนผลภายในห่อมากที่สุด โดยเหลือจำนวนผลมากถึง 70.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการห่อด้วยถุงห่อผลไม้สีขาว ที่ระยะอายุผล 2 เดือน เช่นเดียวกัน ส่วนอายุของผลลิ้นจี่ขณะเริ่มทำการห่อ ต่อจำนวนผลภายในห่อ พบว่า การห่อหุ้มผลที่ระยะอายุผล 2 เดือน สามารถลดการหลุดร่วงของผลในห่อได้ดีกว่าการห่อที่ระยะอายุผล 1 เดือน และเมื่อพิจารณาถึงผลกระทบจากชนิดของวัสดุที่ใช้ห่อ ต่อจำนวนผลต่อห่อโดยเฉลี่ยแล้ว พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) ทางด้านของขนาดผลนั้น พบว่า ผลผลิตส่วนใหญ่จะมีน้ำหนักน้อยกว่า 20 กรัมต่อผล ซึ่งถือว่ามีขนาดเล็ก และปริมาณผลขนาดใหญ่ของแต่ละกรรมวิธีนั้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มี

Table 1 Effect of bagging on percentage of fruits per cluster.

Treatment	Percentage of fruits per cluster		
	Fruit age after fruit set		Average
	1 month	2 months	
Non-bagging (Control)	40.50 bcd ^{1/,2/}	40.50 bcd	40.50 ^{ns}
Newspaper bag	46.50 bc	55.00 abc	50.75
Remay bag	54.00 abc	58.00 ab	56.00
Carbon bag	28.00 d	70.50 a	49.25
Transparent plastic bag	37.50 cd	46.50 bc	42.00
Average	41.30 b ^{2/}	54.10 a	-

^{ns} non-significant

^{1/} Means in the same column with different letter are significantly different ($P < 0.05$)

^{2/} Means in the same row with different letter are significantly different ($P < 0.05$)

แนวโน้มว่าการห่อหุ้มผลด้วยถุงห่อผลไม้สีขาวทั้ง 2 ระยะจะมีปริมาณผลขนาดใหญ่ (>25 กรัมต่อผล) มากที่สุด ทั้งมีจำนวนผลต่อช่อค่อนข้างสูง (ตารางที่ 2)

ทางด้านลักษณะภายนอกของผล ทำการคัดแยกลักษณะผลด้วยสายตาเป็น ผลที่มีลักษณะดี (ผลที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่แตก ไม่เน่าเสีย หรือมีตำหนิที่ส่งผลต่อคุณภาพของผล) ผลที่มีเปลือกเป็นสีน้ำตาล และผลเสีย (ผลแตก, ผลแห้ง, ผลเน่า) พบว่า ปัจจัยของการศึกษาทั้ง อายุผลที่เริ่มทำการห่อ และชนิดของวัสดุที่ใช้ มี interaction ระหว่างกันในส่วนของการเปลี่ยนแปลงสีของผลที่มีลักษณะดี และผลที่มีเปลือกสีน้ำตาลต่อช่อ โดยที่การห่อหุ้มผลด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์, ถุงห่อผลไม้สีขาว ถุงพลาสติกใส และการไม่ห่อหุ้มผล มีปริมาณผลที่มีลักษณะดีสูงที่สุด ในขณะที่การห่อหุ้มผลด้วยถุงคาร์บอนสีน้ำตาลทั้ง 2 ระยะนั้น มีปริมาณผลเปลือกสีน้ำตาลสูงที่สุด ส่วนระยะเวลาที่เริ่มทำการห่อหุ้มผลไม่มีผลต่อลักษณะภายนอกของผลแต่อย่างใด (ตารางที่ 3)

คุณภาพผลในส่วนของสีผิวเปลือก ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (TSS) และปริมาณกรดที่ไทเทรต

ได้ (TA) ของเนื้อ พบว่า มี interaction ระหว่าง 2 ปัจจัยในส่วนของการห่อหุ้มผลของผลลิ้นจี่ (L-value) และ ค่าสีผิว (H-value) โดยการห่อหุ้มผลด้วยถุงคาร์บอนสีน้ำตาลทั้ง 2 ระยะ และการห่อหุ้มผลด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ระยะอายุผล 1 เดือนมีค่าความสว่างของผิว และค่าสีผิว สูงที่สุด โดยที่การห่อหุ้มผลด้วยถุงคาร์บอนสีน้ำตาลสีผิวเปลือกจะเป็นสีแดงปนเหลือง เช่นเดียวกับการห่อหุ้มผลด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ และการไม่ห่อหุ้มผล ส่วนการห่อหุ้มผลด้วยถุงห่อผลไม้สีขาวและถุงพลาสติกใส่นั้นมีสีผิวเปลือก ซึ่งพิจารณาจากค่าสีผิว เป็นสีแดงมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนค่าความเข้มข้น (C-value) ของทุกกรรมวิธี ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) ในส่วนของรสชาติ พบว่ามี interaction ระหว่างปัจจัยทั้งในส่วนของการห่อหุ้มผล, TSS, TA และ TSS/TA โดยการห่อหุ้มผลด้วยถุงห่อผลไม้สีขาวที่ระยะอายุผล 2 เดือน มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้สูงที่สุด ส่วนอัตราส่วนของ TSS/TA พบว่า การห่อหุ้มผลด้วยถุงพลาสติกใสที่ระยะอายุผล 1 เดือนมีค่าสูงที่สุด (ตารางที่ 5)

Table 2 Effect of bagging on percentage of fruit grade in cluster.

Treatment	Percentage of fruit grade in cluster											
	Size A (>25 g/fruit)			Size B (22.1–25 g/fruit)			Size C (20–22 g/fruit)			Size D (<20 g/fruit)		
	Fruit age			Fruit age			Fruit age			Fruit age		
	1 month	2 months	Average	1 month	2 months	Average	1 month	2 months	Average	1 month	2 months	Average
Non-bagging (Control)	1.25 ^{ns}	1.25	1.25 ^{ns}	14.50 ^{ns}	13.08	13.79 ^{ns}	40.89 ^{ns}	42.32	41.61 ^{ns}	43.35 ^{ns}	42.10	42.73 ^{ns}
Newspaper bag	0.00	1.93	0.96	2.86	17.95	10.40	33.34	25.29	29.31	63.80	54.84	59.32
Remay bag	11.67	11.50	11.58	6.79	14.57	10.68	16.89	27.70	22.29	64.66	46.23	55.44
Carbon bag	14.10	2.31	8.20	8.86	17.75	13.30	25.86	30.47	28.16	51.19	49.48	50.33
Transparent plastic bag	2.73	1.83	2.28	3.93	7.00	5.46	40.17	14.71	27.44	53.17	76.45	64.81
Average	5.95 ^{ns}	3.76	-	7.39 ^{1/}	14.07	-	31.43 ^{ns}	28.10	-	55.23 ^{ns}	53.82	-

^{ns} non-significant

1/ Means in the same row with different letter are significantly different (P< 0.05)

Table 3 Effect of bagging on percentage of good quality fruits, brown peel fruits and bad quality fruits.

Treatment	Percentage of good quality fruits			Percentage of brown peel fruits			Percentage of bad quality fruits		
	Fruit age		Average	Fruit age		Average	Fruit age		Average
	1 month	2 months		1 month	2 months		1 month	2 months	
Non-bagging (Control)	70.97 ab ^{1/2/}	69.54 ab	70.26 a ^{1/}	26.35 cd ^{1/2/}	26.53 cd	26.44 b ^{1/}	2.68 ^{ns}	2.68	2.68 ^{ns}
Newspaper bag	84.94 a	50.08 bc	67.51 a	13.52 d	44.03 abc	28.78 b	1.54	0.00	0.77
Remay bag	69.12 ab	88.78 a	78.95 a	30.17 bcd	7.25 d	18.71 b	0.71	3.97	2.34
Carbon bag	39.52 c	40.87 c	40.19 b	60.48 a	57.67 ab	59.07 a	0.00	1.47	0.73
Transparent plastic bag	84.88 a	52.87 bc	68.87 a	9.29 d	45.46 abc	27.37 b	2.50	1.67	2.08
Average	69.89 ^{ns}	60.43	-	27.9 6 ^{ns}	36.19	-	1.49 ^{ns}	1.96	-

^{ns} non-significant

^{1/}Means in the same column with different letter are significantly different (P< 0.05)

^{2/}Means in the same row with different letter are significantly different (P< 0.05)

๕

Table 4 Effect of bagging on color of fruit peel.

Treatment	L-value			C-value			H-value		
	Fruit age		Average	Fruit age		Average	Fruit age		Average
	1 month	2 months		1 month	2 months		1 month	2 months	
Non-bagging (Control)	50.25 b ^{1/2/}	50.25 b	50.25 c ^{1/}	17.53 ^{ns}	17.53	17.53 ^{ns}	50.11 bc ^{1/2/}	50.11 bc	50.11 b ^{1/}
Newspaper bag	58.89 a	51.25 b	55.07 b	23.50	19.73	21.61	65.56 a	43.50 bcd	54.53 ab
Remay bag	48.65 bc	50.01 b	49.33 c	21.8	46.17	33.73	28.73 e	34.99 de	31.87 c
Carbon bag	57.95 a	60.75 a	59.35 a	21.97	24.25	23.11	53.88 ab	66.56 a	60.22 a
Transparent plastic bag	48.98 bc	45.7 3c	47.36 c	18.22	17.00	17.61	39.31 cde	40.05 cde	39.67 c
Average	52.94 ^{ns}	51.60	-	20.50 ^{ns}	24.93	-	47.52 ^{ns}	47.04	-

^{ns} non - significant

๑ ^{1/}Means in the same column with different letter are significantly different (P< 0.05)

^{2/}Means in the same row with different letter are significantly different (P< 0.05)

Table 5 Effect of bagging on total soluble solid (TSS), total titrable acid (TA) and TSS/TA.

Treatment	TSS (⁰ brix)			TA (%)			TSS/TA		
	Fruit age		Average	Fruit age		Average	Fruit age		Average
	1 month	2 months		1 month	2 months		1 month	2 months	
Non-bagging (Control)	17.24 b ^{1/2/}	17.24 b	17.24 a ^{1/}	0.27 ab ^{1/2/}	0.27 ab	0.27 a ^{1/}	64.48 d ^{1/2/}	64.48 d	64.48 c ^{1/}
Newspaper bag	15.66 c	16.98 b	16.32 b	0.25 bc	0.23 cd	0.24 b	64.50 d	73.48 bc	68.99 bc
Remay bag	16.15 c	17.95 a	17.05 a	0.24 c	0.28 a	0.26 a	67.23 cd	67.14 cd	67.19 c
Carbon bag	16.95 b	15.63 c	16.29 b	0.23 cd	0.23 cd	0.23 b	75.49 b	69.67 bcd	72.58 b
Transparent plastic bag	15.67 c	15.66 c	15.67 c	0.19 e	0.22 d	0.20 c	82.21 a	73.33 bc	77.77 a
Average	16.33 b	16.69 a	-	0.23 ^{ns}	0.24	-	70.78 ^{ns}	69.62	-

^{ns} non-significant

^{1/}Means in the same column with different letter are significantly different (P< 0.05)

^{2/}Means in the same row with different letter are significantly different (P< 0.05)

7

วิจารณ์

จากผลการทดลอง พบว่า การห่อหุ้มผลที่ระยะอายุผล 2 เดือน สามารถลดการหลุดร่วงของผลภายในห่อได้ดีกว่าการห่อในระยะอายุผล 1 เดือน โดยเฉพาะการห่อด้วยถุงคาร์บอนสีน้ำตาล ที่เห็นผลชัดเจนที่สุด อาจเนื่องมาจากการห่อผลเป็นระยะเวลานานในสภาพแวดล้อมที่ปิด จะมีการสะสมของก๊าซ ethylene ซึ่งจะกระตุ้นการหลุดร่วงของผลได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อไม่ได้รับแสงเป็นเวลานาน ซึ่งถุงคาร์บอนสีน้ำตาลนั้น พบว่ามีคุณสมบัติในการพร่างแสงได้เป็นอย่างดี ดังนั้น ผลลึ้นจึงไม่ได้รับแสงเลยตลอดเวลาที่ทำห่อ ส่วนวัสดุชนิดอื่นที่ใช้ห่อ พบว่าแสงสามารถผ่านทะลุได้ดีกว่า นอกจากนั้นยังพบว่า การห่อหุ้มผลลึ้นด้วยถุงห่อผลไม้สีขาวมีแนวโน้มในการเพิ่มปริมาณผลขนาดใหญ่ภายในห่อได้ค่อนข้างดี ดังรายงานของ Thorpe (1974) ที่ว่าการพร่างแสง หรือการได้รับความเข้มแสงที่เหมาะสมสามารถเพิ่มน้ำหนักของผลได้ เช่นเดียวกับกับรายงานของ Tombesi *et al.* (1993) ที่ว่าการห่อผลสามารถเพิ่มขนาดของผลได้ เนื่องจากสามารถรักษาความชื้นในผลไว้ได้ ทำให้ลดปัญหาการขาดน้ำของผล

ในส่วนของการเลือก พบว่าการห่อด้วยถุงห่อผลไม้สีขาว และถุงพลาสติกใสทำให้เปลือกผลมีสีแดงมากกว่าการไม่ห่อหุ้มผล และการห่อด้วยวัสดุอื่น ๆ เนื่องจากการห่อหุ้มผล นอกจากจะสามารถช่วยป้องกันการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืชแล้ว การห่อหุ้มผลด้วยวัสดุที่เหมาะสมนั้นยังสามารถช่วยในการพัฒนาสีผิวเปลือกของลึ้นให้ดีขึ้นได้อีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Hu *et al.* (2001) ซึ่งพบว่า การใช้ถุงกระดาษสีขาวกับลึ้นพันธุ์ Tai So ในออสเตรเลียสามารถเพิ่มทั้งขนาดและคุณภาพของสีผิวเปลือกได้ ส่วนการห่อด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์และถุงคาร์บอนสีน้ำตาลมีสีเปลือกเป็นสีแดงปนเหลืองมากกว่า เนื่องจากสีแดงของเปลือกลึ้นนั้น ประกอบด้วยสาร anthocyanin ซึ่งจะสร้างได้ดีในขณะที่ได้รับแสงที่เหมาะสม และการห่อหุ้มผลด้วยถุงห่อผลไม้สีขาว และถุงพลาสติกใสก็น่าจะช่วยให้ลึ้นได้รับแสงที่เหมาะสม

ได้ดีกว่าเช่นกัน นอกจากนั้นการห่อหุ้มผลโดยใช้วัสดุและระยะเวลาต่าง ๆ ยังทำให้ผลลึ้นที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่การห่อด้วยถุงห่อผลไม้สีขาวที่ระยะอายุผล 2 เดือน มีทั้งปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้สูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงการสุกแก่ของผลจากค่าทั้งสอง พบว่าทุกกรรมวิธีมีการสุกแก่ใกล้เคียงกัน

สรุป

1. การห่อหุ้มผลที่ระยะอายุผล 2 เดือน สามารถลดการหลุดร่วงของผลภายในห่อได้ดีกว่าการห่อในระยะอายุผล 1 เดือน
2. การห่อด้วยถุงห่อผลไม้สีขาว และถุงพลาสติกใสทำให้เปลือกผลมีสีแดงมากกว่าการไม่ห่อหุ้มผล
3. การห่อหุ้มผลด้วยถุงห่อผลไม้สีขาวที่ระยะอายุผล 2 เดือน มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ของเนื้อสูงที่สุด
4. การห่อหุ้มผลด้วยวัสดุและระยะเวลาต่าง ๆ ไม่มีผลต่อระยะเวลาการสุกแก่ของผลลึ้นพันธุ์ฮุยฮวย

เอกสารอ้างอิง

- ธีรบุษ เจริญกิจ, พาวิน มะโนชัย, นพดล จรัสสัมฤทธิ์ และ วรินทร์ สุธน. 2545. อิทธิพลของการห่อหุ้มต่อคุณภาพสีผิวของลำไยหลังการเก็บเกี่ยว. หน้า 4. ใน: เอกสารบทความวิชาการประชุมวิชาการเกษตรนเรศวรครั้งที่ 1. 28-29 กรกฎาคม 2545. มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- รวี เสริฐภักดี. 2540. การติดผลและการเจริญเติบโตของลึ้นจีและลำไย. หน้า 43-65. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรเทคโนโลยียุคใหม่ในการผลิตลึ้นจีและลำไย. 4-6 พฤศจิกายน 2540. โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์, เชียงใหม่.

- Hu. G., D. Chen and P. Li. 2001. Effects of bagging on fruit coloration and phenylalanine ammonia-lyase and polyphenol oxidase in 'Feizixiao' Litchi. *Acta Horticulturae*. 558: 273-278.
- Thorpe, M.R. 1974. Radiant heating of apples. *J. Appl. Ecol.* 11: 755-760.
- Tombesi, A., E. Antognozzi and A. Palliotti. 1993. Influence of light exposure on characteristics and storage life of kiwifruit. *New Zealand J. Crop Hortic. Sci.* 21: 185-190.
-

ผลของโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลที่มีต่อ การออกดอกของลั่นจีพันธุ์จักรพรรดิ

Effect of Potassium Chlorate in Combination with Paclobutrazol on Flowering of Lychee cv. Chakrapat

วัชรพล สิงหากัน^{1/} และ ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข^{1/}

Watcharapon Singhagun^{1/} and Tanachai Pankasemsuk^{1/}

Abstract: Effect of potassium chlorate in combination with paclobutrazol on flowering of 2 year-old layering of lychee cv. Chakrapat. The experiments were carried out during June 2004 to February 2005 at the Department of Horticulture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand. The concentrations of potassium chlorate : paclobutrazol were 1.00:9.00, 1.25:8.75 and 1.67:8.33 g compared to the untreated (control). The results showed that potassium chlorate in combination with paclobutrazol at 1.25:8.75, 1.00:9.00 and 1.67:8.33 g gave flowering with percentage of 75.00, 87.50 and 100 % respectively while the control did not show flowering .

Keywords: Potassium chlorate, paclobutrazol, flowering, lychee cv. Chakrapat

บทคัดย่อ: การศึกษาผลของโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลที่มีต่อการออกดอก ของกิ่งตอนลั่นจีพันธุ์จักรพรรดิอายุ 2 ปี ในระหว่างเดือน มิถุนายน พ.ศ. 2547 ถึง เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2548 ที่ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยมีการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลในอัตราความเข้มข้น 1.00:9.00 1.25:8.75 และ 1.67:8.33 กรัม เปรียบเทียบกับการไม่ใช้สาร(ชุดควบคุม) พบว่า การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลความเข้มข้น 1.25:8.75 1.00:9.00 และ 1.67:8.33 กรัม ให้เปอร์เซ็นต์การออกดอก 75.00 87.50 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่มีการออกดอก

คำสำคัญ: โพแทสเซียมคลอเรต พาโคลบิวทราโซล การออกดอก ลั่นจีพันธุ์จักรพรรดิ

^{1/}ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) เป็นไม้ผลที่อยู่ในวงศ์ Sapindaceae มีแหล่งกำเนิดในประเทศจีน ซึ่งต่อมามีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยและได้กลายเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย แต่แหล่งปลูกลิ้นจี่ให้ได้ผลดีนั้นก็มีจำกัด เพราะลิ้นจี่ต้องการสภาพอากาศเฉพาะตัวเพื่อการออกดอกติดผล (Subhadrabandhu, 1990) ลิ้นจี่ที่ปลูกในประเทศไทยสามารถแบ่งกว้าง ๆ ได้ 2 สายพันธุ์คือ ลิ้นจี่ที่ปลูกในภาคกลาง และพันธุ์ลิ้นจี่ที่ปลูกในภาคเหนือ โดยที่ลิ้นจี่ที่ปลูกในภาคกลางต้องการสภาพอากาศหนาวเย็นก่อนการออกดอกน้อยกว่าลิ้นจี่ที่ปลูกในภาคเหนือ และลิ้นจี่ที่ปลูกในภาคเหนือก็ยังมีหลายสายพันธุ์ที่มีความต้องการอุณหภูมิต่ำกว่าก่อนการออกดอกที่แตกต่างกัน เช่น พันธุ์ฮงฮวยต้องการอุณหภูมิต่ำกว่าก่อนการออกดอกน้อยกว่าพันธุ์จักรพรรดิ ดังนั้นการปลูกลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิ จึงนิยมปลูกในที่ที่มีอากาศหนาวเย็นเป็นเวลานาน เช่นในบริเวณภูเขาสูงของภาคเหนือของประเทศไทย (ศรีมูล, 2531)

ในประเทศไทยมีการปลูกลิ้นจี่มาเป็นเวลานาน แต่ยังมีพัฒนาการปลูกลิ้นจี่ไม่มากนัก ชาวสวนมักพบอุปสรรคสำคัญคือ ความไม่แน่นอนและความไม่สม่ำเสมอในการออกดอกและติดผลของลิ้นจี่ เช่น ลิ้นจี่บางพันธุ์วันสองปีออกดอกครั้งหนึ่ง บางพันธุ์ออกดอกปีเว้นปี บางพันธุ์ออกดอกติดผลทุกปีแต่มาบ้างน้อยบ้างไม่สม่ำเสมอ จากปัญหาที่พบจึงได้มีการทดลองใช้กรรมวิธีต่าง ๆ เพื่อช่วยให้ลิ้นจี่ออกดอกเพิ่มขึ้น โดยที่วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการแก้ปัญหาหลายวิธีการด้วยกัน เช่น การรมควัน การควันกิ่ง การตัดแต่งราก ตลอดจนการงดน้ำก่อนฤดูการออกดอก (ศรีมูล, 2531) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีควบคุมการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิดเพื่อการแก้ปัญหาการออกดอกที่ไม่สม่ำเสมอโดยมีการใช้ทั้งสารที่มีคุณสมบัติกระตุ้น และยับยั้งการเจริญเติบโต หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน (ดรุณี, 2539) เช่น การใช้สารพาโคลบิวทราโซล ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มสารชะลอการเจริญเติบโต โดยมีการใช้สารพาโคลบิวทราโซลเพียงอย่างเดียว (สุจริต, 2531; Menzel and Simpson, 1990), พาโคลบิวทราโซล ร่วมกับ เอททีฟอน (Chaitrakulsub

et al., 1992), พาโคลบิวทราโซลร่วมกับเอททีฟอนและเบนซิลอะดีนีน (วัชรพล, 2539) แต่ยังไม่พบวิธีการใดที่มีประสิทธิภาพในการบังคับลิ้นจี่ออกดอกได้

การใช้สารพาโคลบิวทราโซลกับพืช สามารถให้ทางราก ลำต้น และการพ่นทางใบ การเคลื่อนที่ของพาโคลบิวทราโซลจะผ่านทางท่อน้ำไปทีใบและตา แต่จะไม่เคลื่อนที่ทางท่ออาหาร พาโคลบิวทราโซลใช้ได้ดีกับพืชหลายชนิด โดยที่พาโคลบิวทราโซลไปยับยั้งการสร้างจิบเบอเรลลิน ซึ่งมีผลให้ลดการเจริญทางด้านกิ่งใบและนำอาหารกลับไปช่วยในการเจริญทางด้านดอก และผล ซึ่งมีผลทำให้ลดการเจริญเติบโตของพืชได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการสร้างตาออก ทำให้ดอกทนทานต่อน้ำค้างแข็ง และเพิ่มการติดผลในไม้ผลหลายชนิด (ICI, 1984)

โพแทสเซียมคลอเรต เป็นสารที่มีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายแป้งแต่ไม่มีความมันวาว ไม่ดูดซับความชื้นจากบรรยากาศ ผลทางสรีรวิทยาของสารประกอบคลอเรตที่มีต่อต้นพืชพอสรุปได้ ดังนี้

คลอเรตอิออน (ClO_3^-) จัดเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับไนเตรตอิออน (NO_3^-) ดังนั้นคลอเรตอิออนจึงเป็นคู่แข่ง (competitive inhibitor) ของไนเตรตอิออน แม้ว่าคลอเรตจะไปมีผลต่อกลไกการใช้ไนโตรเจนของพืช แต่ก็ไม่พบอาการขาดธาตุไนโตรเจนในต้นพืชที่ได้รับสารประกอบคลอเรต ในทางตรงกันข้ามต้นลำไยที่ได้รับสารประกอบคลอเรตกลับมีใบสีเขียวเข้มมากขึ้น สารประกอบคลอเรตมีผลในการลดการทำงานของเอนไซม์แคตตาเลส (catalase) สำหรับในพืชที่อ่อนแอต่อการเกิดพิษของสารประกอบคลอเรต การทำงานของเอนไซม์แคตตาเลสอาจลดลงถึงครึ่งหนึ่ง จึงทำให้มีการสะสมของสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen per-oxide, H_2O_2) ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดว่าเป็นสารพิษภายในเซลล์ คลอเรตแม้ความเข้มข้นต่ำ ๆ เพียง 0.01 M (โมลาร์) ก็สามารถทำให้เซลล์พืชฝ่อได้เนื่องจากการสูญเสีย (plasmolysis) คลอเรตกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนที่มีความจำเป็นในการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตส (nitrate reductase) คลอเรตมีผลในการลดอาหารสำรองในต้นพืช เมื่อพืชมีอัตราการหายใจเพิ่มขึ้นจึงจำเป็นที่จะต้องใช้อาหารสะสมภายในต้นพืช

มากขึ้น ดังนั้นอาหารสำรองในต้นพืชจึงลดลง คลอเรตทำให้การไหลเวียนของโปรโตพลาสซึมช้าลง เมื่อการไหลเวียนของโปรโตพลาสซึมลดลง การเคลื่อนย้ายของสารบางชนิดภายในพืชที่เคลื่อนที่ผ่านทางโปรโตพลาสซึมย่อมลดลงด้วย นอกจากนั้น สารประกอบคลอเรตยังมีผลทางสรีรวิทยาต่อต้านพืช คือกระตุ้นการสร้างเอทิลีน และกระตุ้นการออกดอกของต้นลำไยได้ด้วย (ธนะชัย, 2542)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษา ผลของสารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรตร่ว่กับสารพาโคลบิวทราโซล ที่มีต่อการออกดอกของล้ันจ้พันธุ์จักรพรรดิ เพื่อที่จะได้นำไปเป็นแนวทางในการวิจัย และพัฒนาในงานด้านเกี่ยวกับล้ันจ้ ในการเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาการออกดอกที่ไม่สม่าเสมอของล้ันจ้ ซึ่งจะเป็ประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำธุรกิจสวนล้ันจ้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำกิ่งตอนล้ันจ้พันธุ์จักรพรรดิอายุ 2 ปีซึ่งปลูกอยู่ในถุงพลาสติกสีดำเส้นผ่านศูนย์กลางของถุง 12 นิ้ว จากนั้นย้ายมาปลูกในกระถางดินเผาขนาดความจุ 20 ลิตร (เส้นผ่านศูนย์กลางของกระถาง 15 นิ้ว) ในเดือนมิถุนายน 2547 โดยใช้ทรายเป็นวัสดุปลูก ให้น้ำทุกวัน และให้สารอาหารที่อยู่ในรูปสารละลายทุก 7 วัน ซึ่งประกอบด้วยธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง (Hoagland and Arnon, 1952) โดยปรับความเป็นกรดต่างที่ 6.5 จากนั้นรดด้วยสารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรต ($KClO_3$) ร่ว่กับพาโคลบิวทราโซล (PP333) ในวันที่ 2 กรกฎาคม 2547 ในความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ และใช้วิธีการไม่รดสาร (control) เป็นตัวเปรียบเทียบ วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลิ๊อกสมบรูณ์ (RCB) ประกอบด้วย 4 กรรมวิธี จำนวน 8 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น ซึ่งในแต่ละกรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 ไม่รดสาร (control)

กรรมวิธีที่ 2 รดสารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรต ร่ว่กับสารพาโคลบิวทราโซล อัตราส่วน 1.00:9.00 กรัม/กระถาง

กรรมวิธีที่ 3 รดสารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรต ร่ว่กับสารพาโคลบิวทราโซล อัตราส่วน 1.25:8.75 กรัม/กระถาง

กรรมวิธีที่ 4 รดสารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรต ร่ว่กับสารพาโคลบิวทราโซล อัตราส่วน 1.67:8.33 กรัม/กระถาง

โดยมีการศึกษาผลของไฟฟ้แสงเทียมคลอเรต ร่ว่กับพาโคลบิวทราโซลที่มีผลต่อจำนวนวันที่ออกดอก หลังรดสาร เปอร์เซ็นต์การออกดอก จำนวนช่อดอกต่อต้น ความยาวของช่อดอก และความกว้างของช่อดอก

ทำการทดลองที่แปลงวิจัยไ้ผล ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือน มิถุนายน 2547 ถึง กุมภาพันธ์ 2548

ผลการทดลอง

จำนวนวันที่ล้ันจ้ออกดอกหลังรดสาร พบว่าต้นที่ได้รับสารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรตร่ว่กับพาโคลบิวทราโซล ในอัตราความเข้มข้น 1.00:9.00 1.25:8.75 และ 1.67:8.33 มีจำนวนวันที่ออกดอกหลังรดสาร 175.85 174.33 และ 175.00 วัน ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ส่วนต้นที่ไม่ได้รดสารไม่มีการออกดอก สำหรับเปอร์เซ็นต์การออกดอก พบว่าการใช้สารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรตร่ว่กับพาโคลบิวทราโซลทุกความเข้มข้น ให้เปอร์เซ็นต์การออกดอกแตกต่างจากต้นที่ไม่ให้สาร โดยที่ความเข้มข้นในอัตรา 1.67:8.33 กรัม ให้เปอร์เซ็นต์การออกดอกได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ อัตราความเข้มข้น 1.25:8.75 และ 1.00:9.00 กรัม ให้เปอร์เซ็นต์การออกดอก 75.00 และ 87.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนต้นที่ไม่ได้รดสารไม่มีการออกดอก ส่วนจำนวนช่อดอกต่อต้น พบว่าใช้สารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรตร่ว่กับพาโคลบิวทราโซล ในอัตรา 1.67:8.33 กรัม ช่วยให้มีจำนวนช่อดอกต่อต้นมากที่สุด คือ 9.00 ช่อ และแตกต่างจากการใช้สารอัตราความเข้มข้น 1.00:9.00 กรัม และ 1.25:8.75 กรัม โดยมีจำนวนช่อดอก 2.30 และ 5.80 ช่อ ตามลำดับ ความยาวของช่อดอก พบว่าการใช้สารไฟฟ้แสงเทียมคลอเรตร่ว่กับพาโคลบิวทราโซลทุกความเข้มข้น ให้ความยาวช่อดอกไม่ต่างกัน คือการใช้สารในอัตราความเข้มข้น 1.00:9.00 1.25:8.75 และ 1.67:8.33 กรัม ให้ค่าเฉลี่ยความยาวของช่อดอก 4.65 5.17 และ 5.08 เซนติเมตร ตามลำดับ และความกว้างของช่อดอก

Table 1 Flowering time, flowering percentage, number of panicle/tree, panicle length and panicle width of lychee cv. Chakrapat

Treatment	Flowering time (days after treated)	Flowering percentage	Number of panicle/tree	Panicle length (cm)	Panicle width (cm)
control	0a ^{1/}	0a	0a	0a	0a
KClO ₃ :PP333(1.00:9.00)	175.85 b	87.50 b	2.30 a	4.65 b	2.75 b
KClO ₃ :PP333(1.25:8.75)	174.33 b	75.00 b	5.80 a	5.17 b	2.93 b
KClO ₃ :PP333(1.67:8.33)	175.00 b	100.00 b	9.00 b	5.08 b	2.79 b

^{1/}Means in the same column followed by different letters are significant difference by LSD (P <0.05).

พบว่าการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลทุกความเข้มข้น ให้ความกว้างของช่อดอกไม่ต่างกัน คือการใช้สารในอัตราความเข้มข้น 1.00:9.00 1.25:8.75 และ 1.67:8.33 กรัม ให้ค่าเฉลี่ยความกว้างของช่อดอก 2.75 2.93 และ 2.79 เซนติเมตร ตามลำดับ

วิจารณ์

การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซล ช่วยทำให้ลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิมีเปอร์เซ็นต์การออกดอกตั้งแต่ 75-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นที่ไม่ได้รับสาร ไม่มีการออกดอกเลย ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากสารโพแทสเซียมคลอเรต และสารพาโคลบิวทราโซลมีผลต่อการปรับสมดุลของฮอร์โมนภายในต้นลิ้นจี่ให้เหมาะสมกับการออกดอก การที่นำสารทั้ง 2 ชนิดมาใช้ร่วมกันกับทำให้ลิ้นจี่พันธุ์จักรพรรดิออกดอกได้นั้น ไปสอดคล้องกับรายงานของวัชรพล และ ธนะชัย (2547) ที่พบว่า การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลช่วยทำให้ลิ้นจี่พันธุ์คอมพิวเตอร์ออกดอกได้เร็วขึ้นประมาณ 2 สัปดาห์ แสดงว่าสาร ทั้ง 2 ชนิดนี้น่าจะทำงานเสริมซึ่งกันและกัน โดยที่สารพาโคลบิวทราโซลจะไปทำให้สารจิบเบอเรลลินในต้นลิ้นจี่ลดลง ส่วนสารโพแทสเซียมคลอเรตจะไปช่วยเพิ่มการสร้างสารเอทิลีนในต้นลิ้นจี่ นอกจากนี้ Chen

(1990) ยังกล่าวว่าจิบเบอเรลลินจะมีปริมาณต่ำในช่วง 30 วัน ก่อนการออกดอก ซึ่งสารพาโคลบิวทราโซลก็จะทำให้ต้นพืชที่ได้รับสารนี้มีปริมาณจิบเบอเรลลินลดลง Chen and Ku (1988) ยังพบอีกว่า การใช้สารเอทิลีนซึ่งเป็นสารที่ให้เอทิลีนร่วมกับสารโคเนตินจะช่วยชักนำการออกดอกของลิ้นจี่ได้ดีกว่าการใช้สารชนิดเดียว นอกจากนั้นยังมีการทดลองใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต หรือพาโคลบิวทราโซลเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในความเข้มข้นเดียวกันกับงานทดลองครั้งนี้ คือใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตอัตรา 1.00 1.25 และ 1.67 กรัม/กระถาง และพาโคลบิวทราโซลอัตรา 8.37 8.75 และ 9.00 กรัม/กระถาง พบว่าไม่มีสารชนิดใดช่วยทำให้ลิ้นจี่ออกดอกได้ แสดงว่าการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรต หรือพาโคลบิวทราโซล เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งจะไปมีผลต่อฮอร์โมนพืชที่แตกต่างกัน และไม่มีอิทธิพลเพียงพอที่จะชักนำให้ดอกออกได้ เพราะการออกดอกของลิ้นจี่น่าจะเกิดจากการปรับสมดุลของฮอร์โมนหลายชนิดภายในต้นมากกว่าที่จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ส่วนการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรตร่วมกับพาโคลบิวทราโซลในอัตรา 1.67:8.33 กรัม ทำให้มีการออกดอกได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าอัตราส่วนของสารทั้งสองน่าจะเหมาะสมในการทำให้เกิดสมดุลของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการออกดอกของลิ้นจี่

สรุป

การใช้สารโพแทสเซียมคลอไรด์ร่วมกับพาโคลบิวทราโซล ช่วยทำให้ลitchiพันธุ์จักรพรรดิออกดอกได้ตั้งแต่ 75-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นที่ไม่ให้สารไม่มีการออกดอก และในกลุ่มที่ได้รับสารด้วยกัน การใช้สารในอัตรา 1.67:8.33 กรัม ทำให้มีจำนวนช่อดอกต่อต้นมากที่สุด ส่วนลักษณะอื่น ๆ เช่น จำนวนวันที่ออกดอกหลังราดสาร ความยาวของช่อดอก และความกว้างของช่อดอก ต้นที่ได้รับสารทุกความเข้มข้นให้ผลไม่แตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

- ดรุณี นามพรหม. 2539. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคลอไรด์ไซโตไคนินในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลitchiพันธุ์สงขลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 88 หน้า.
- ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข. 2542. ลำไยกับสารประกอบคลอไรด์. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 53 หน้า.
- วัชรพล สิงห์กัน. 2539. ผลของพาโคลบิวทราโซลเอทฟีฟอน และเบนซิลอะดีนีน ที่มีผลต่อการออกดอก และผลของปุ๋ยยูเรียที่มีต่อการแตกใบอ่อนของลitchiพันธุ์สงขลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 99 หน้า.
- วัชรพล สิงห์กัน และ ธนะชัย พันธุ์เกษมสุข. 2547. ผลของโพแทสเซียมคลอไรด์ร่วมกับพาโคลบิวทราโซลที่มีต่อการออกดอกของลitchiพันธุ์ค่อม. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35(5-6) (พิเศษ): 103-106.
- ศรีมูล บุญรัตน์. 2531. การปลูกลitchi. สถานีทดลองพืชสวนฝาง สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 80 หน้า.

สุจิตต์ แซ่ตั้ง. 2531. ผลของ paclobutrazol ต่อการออกดอกและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาบางประการของลitchiพันธุ์สงขลา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 69 หน้า.

Chaitrakulsub, T., S. Subhadrabandhu, T. Powsung, R. Ogata and H. Gemma. 1992. Effect of paclobutrazol with ethephon on flowering and leaf flushing of lychee cv. Hong Huay. Acta Hort. 321: 303-308.

Chen, W.S. 1990. Endogenous growth substances in xylem and shoot tip diffusate of lychee in relation to flowering. HortScience. 25(3): 314-315.

Chen, W.S. and M.L. Ku. 1988. Ethephon and kinetin reduce shoot length and increase flower bud formation in lychee. HortScience. 23(6): 1078.

ICI. 1984. Paclobutrazol Plant Growth Regulator for Fruit. Technical data sheet of Imperial Chemical Industries PLC, Surrey. 40 pp.

Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. 1952. The Water Culture Method for Growing Plants Without Soil. Bulletin No. 147. California Agricultural Experiment Station, Berkeley.

Menzel, C.M. and D.R. Simpson. 1990. Effect of paclobutrazol on growth and flowering of lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). Aust. J. Exp. Agri. 30: 131-127.

Subhadrabandhu, S. 1990. Lychee and Longan Cultivation in Thailand. Rumthai Pub., Bangkok. 40 pp.

การปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ของพริกเผ็ด โดยใช้ลักษณะ เกสรเพศผู้เป็นหมัน

Improvement of F_1 Hybrid Chili Using Male Sterility

จุฑามาส คุ่มชัย^{1/} และ มณีจัตรา นิกรพันธุ์^{1/}

Jutamas Kumchai^{1/} and Maneechat Nikronpun^{1/}

Abstract: F_1 hybrid seeds are expensive and the uses of male sterility to produced F_1 hybrid seeds would decrease cost of production. Three female lines (Smsms) were crossed to two male lines. Six F_1 hybrids were obtained. It was shown that F_1 hybrid variety, 2735BC₂ #16-1-4 × PG. 5-3-1-1, gave the best yield, 1,538.47 kg/rai and the highest heterosis among the 6 F_1 . PG. 5-3-1-1 variety was used a male line, the F_1 hybrid varieties yielded range from 1,081.13 to 1,538.47 kg/rai, which were not significantly different from PG. 5-3-1-1 which was the male parent (1,376.87 kg/rai) and commercial varieties, Maeping 80 and Chakrapat (1,346.81 and 2,076.81 kg/rai) respectively. When varieties PG. 25-1-1-1 variety was used as a male line, the F_1 hybrids yielded 545.06 - 987.56 kg/rai which were lower than their own male parental variety (1,157.91 kg/rai) and commercial varieties Maeping 80 and Chakrapat (1,346.81 and 2,076.81 kg/rai) respectively.

Keywords: heterosis, male sterility, chili

บทคัดย่อ: เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 มีราคาแพง ดังนั้น จึงนำสายพันธุ์แม่ที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันมาผสมกับสายพันธุ์พ่อที่มีลักษณะเด่นสูงที่สุด (PG. 5-3-1-1) เพื่อผลิตพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ โดยใช้สายพันธุ์แม่จำนวน 3 สายพันธุ์ มีจีโนไทป์ Smsms ผสมกับสายพันธุ์พ่อ 2 พันธุ์ ได้ลูกผสมจำนวน 6 คู่ผสม พบว่าพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 2735BC₂ #16-1-4 × พจ. 5-3-1-1 ให้ผลผลิตดีที่สุด (1,538.47 กิโลกรัม/ไร่) และมีเปอร์เซ็นต์ความดีเด่นสูงที่สุดในกลุ่มลูกผสมทั้ง 6 คู่ สายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ ให้ลูกผสมชั่วที่ 1 มีผลผลิตอยู่ในช่วง 1,081.13 - 1,538.47 กิโลกรัม/ไร่ โดยมีผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ กับสายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อ (1,376.87 กิโลกรัม/ไร่) และพันธุ์การค้าพันธุ์แม่โป่ง 80 และพันธุ์จักรพรรดิ (1,346.81 และ 2,076.81 กิโลกรัม/ไร่) ตามลำดับ เมื่อสายพันธุ์ พจ. 25-1-1-1 ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ ให้ลูกผสมชั่วที่ 1 มีผลผลิต อยู่ในช่วง 545.06 - 987.56 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งต่ำกว่าสายพันธุ์พ่อ (1,157.91 กิโลกรัม/ไร่) และพันธุ์การค้าแม่โป่ง 80 และพันธุ์จักรพรรดิ (1,346.81 และ 2,076.81 กิโลกรัม/ไร่) ตามลำดับ

คำสำคัญ: ความดีเด่นของลูกผสม เกสรเพศผู้เป็นหมัน พริกเผ็ด

^{1/}ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200.

^{1/}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

พริก (*Capsicum* spp.) จัดอยู่ในตระกูล Solanaceae มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา ถูกนำมาเผยแพร่ในเอเชียโดยชาวสเปนและชาวโปรตุเกส (Purseglove, 1968) และได้รับการยอมรับอย่างมากมายจากประชากรในประเทศไทย โดยเป็นอาหารที่รสที่สำคัญ (มณีจันทร์, 2541) พันธุ์พริกที่เกษตรกรใช้เป็นพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ผสมเปิด เช่น พริกบางช้าง พริกจินดา พริกห้วยสีทัน เมื่อขยายผลผลิตแล้วเกษตรกรมักเก็บเมล็ดที่เหลือจากต้นในรุ่นหลังๆ เพื่อปลูกในฤดูกาลต่อไป จึงทำให้ขาดการคัดเลือกพันธุ์ปลูกที่ดี ไม่มีการควบคุมการถ่ายละอองเกสร ถึงแม้พริกจะเป็นพืชผสมตัวเองแต่ก็มีอัตราการผสมข้ามสูง เมื่อนำเมล็ดที่เก็บไว้มาปลูกจะให้ผลผลิตที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นเกษตรกรจึงหันมาปลูกเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 แทน ซึ่งเมล็ดพันธุ์มีคุณภาพและให้ผลผลิตสูง แต่เมล็ดพันธุ์มีราคาแพง เนื่องจากกระบวนการผลิตใช้การตอนเกสรเพศผู้ (กฤษฎา, 2544) เพื่อลดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้จึงได้นำลักษณะการเป็นหมันของเกสรเพศผู้ (male sterility) มาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์แม่ (Basset, 1986) เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 รวมทั้งพัฒนาให้มีความเผ็ดสูงและให้ผลผลิตสูงเป็นที่ต้องการของตลาด Patel *et al.* (2001) ได้ผลิตพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ของพริกเผ็ดโดยใช้ลักษณะความเป็นหมันที่ควบคุมโดยยีน ms ทำให้ทำงานได้สะดวก รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย เมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ได้มีต้นทุนที่ต่ำกว่าเดิม ในปีเดียวกัน Nikolova *et al.* (2001) ศึกษาการเป็นหมันในเกสรเพศผู้ของพริกพันธุ์ปลูกและลูกผสม โดยใช้สายพันธุ์เกสรเพศผู้เป็นหมัน จากการทดลองพบว่าลักษณะ homozygous recessive (msms) มีการกระจายตัวมากในรุ่น F_2 ส่วน Ms เป็นยีนที่แสดงการข่มสมบูรณ์พบอยู่ใน genotype แบบ Msms อยู่ในต้นเพศเมียของลูกผสมชั่วที่ 1 และ 2 การประเมินเพื่อสร้างลูกผสม จะใช้ปรากฏการณ์ของ heterosis ที่แสดงผลผลิตสูง ซึ่ง Ahmed *et al.* (1999) รายงานว่าความดีเด่นของลูกผสมพริกเผ็ดจำนวน 6 สายพันธุ์ได้มาจากการผสมข้ามแบบพบกันหมดโดยไม่ผสมกลับพ่อแม่ พบว่า มีความดีเด่นของลูกผสมมากกว่าพ่อแม่ที่ดีด้านผลผลิตและให้ผลผลิต

เร็ว ซึ่งพบในพันธุ์ Shalimar Long $\times$ SPE-1 สายพันธุ์ Shalimar Long และ Elephant Trunk มี general combining ability (gca) สูงเกือบทุกลักษณะ พันธุ์ Punjab Lal G-4 และ Pusa Jwala แสดงลักษณะ gca สูงด้านจำนวนผล และมี 4 คู่ผสมที่มี specific combining ability (sca) สูงด้านผลผลิต พริกมีสารที่ให้ความเผ็ด (capsaicinoid) เป็นสารอัลคาลอยด์ มักเรียกรวมว่า capsaicin มีสูตรทางเคมี คือ $C_{18}H_{27}NO_3$ จะมีมากในส่วนของไส้กลาง (placenta) การปรับปรุงพันธุ์ทางด้านความเผ็ดมีผู้ศึกษา คือ Bosland *et al.* (1993) โดยคัดเลือกพริกจากประชากรผสมเปิดพันธุ์ New Mexico 6-4 โดยวิธีจุดประวัติ นำมาปลูกทดสอบ 4 ปี ให้ผลมีสีที่สกัดได้สูง ความชื้นต่ำ และความเผ็ดต่ำ ใหญ่ของผลกลม ผลเรียบ เนื้อบาง ให้ผลผลิตสูง และนำมาวิเคราะห์สาร capsaicin พบว่า เป็นพริกเผ็ดปานกลาง ที่ 302 Scoville units ในการทดลองนี้ได้นำเอาลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันโดยยีนและไซโทพลาซึมเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมซึ่งสะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้สายพันธุ์แม่ที่มีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นหมันโดยยีนและไซโทพลาซึม และศึกษาความสามารถในการรวมตัวของพ่อแม่ โดยเปรียบเทียบน้ำหนักผลผลิตและปริมาณสารแคปไซซิน

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 คัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ และผสมข้ามเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1

รวบรวมพริกพันธุ์ผสมเปิดจากศูนย์วิจัยพืชสวน พิจิตร จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ พจ. 07, พจ. 06, พจ. 27-1-2-1 พจ. 25-1-1-1 พจ. 2-2-1-1 พจ. 4-1-1-1 พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 6-1-1-1 ศึกษาลักษณะทางพืชสวน ดังนี้ สีผลอ่อน สีผลแก่ ความยาวผล ความกว้างผล รูปร่างลักษณะของผล การวางตัวของก้านผล การติดผล

ความสูงของต้น ลักษณะทรงพุ่ม การเป็นหมันของเกษตรกรผู้ ความมีรสเผ็ดของผล น้ำหนักผลผลิตและปริมาณสารแคปไซซิน ได้สายพันธุ์พ่อ 2 สายพันธุ์ คือ พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 25-1-1-1 นำมาผสมกับสายพันธุ์แม่ที่มีลักษณะเกษตรกรผู้เป็นหมันโดยยีนและไซโทพลาซึม เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์พริกลูกผสมชั่วที่ 1 โดยนำเมล็ดพันธุ์แม่มาจากการทดลองของ กนกวรรณ (2545) ได้แก่สายพันธุ์ 2740BC₂#10-3-3, 2735BC₂#14-2-1 และ 2735BC₂#16-1-4

การทดลองที่ 2 ปลูกทดสอบลูกผสมชั่วที่ 1

นำเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการทดลอง ที่ 1 จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ 2735BC₂#14-2-1 x พจ. 25-1-1-1, 2735BC₂#14-2-1 x พจ. 5-3-1-1, 2735BC₂#16-1-4 x พจ. 25-1-1-1, 2735BC₂#16-1-4 x พจ. 5-3-1-1, 2740BC₂#10-3-3 x พจ. 25-1-1-1, 2740BC₂#10-3-3 x พจ. 5-3-1-1 มาปลูกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อและพันธุ์การคำนวณลูกผสมชั่วที่ 1 คือ พันธุ์แม่ปึง 80 และ พันธุ์จักรพรรดิ บันทึกน้ำหนักผลผลิต หาปริมาณสารแคปไซซินโดยวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 750 นาโนเมตร ทดสอบความเผ็ดโดยใช้คนชิม 10 คน (ใช้ระดับความเผ็ด 0 – 7 โดย 0 หมายถึง ไม่เผ็ด และ 7 หมายถึง เผ็ดมาก) ดูความสามารถในการรวมตัวของคู่ผสม (combining ability) จากความดีเด่นของลูกผสม ซึ่งคำนวณได้ดังนี้ (ดำเนิน, 2545)

% heterosis ของผลผลิต =

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ยผลผลิตของลูกผสมต่อต้าน} - \text{ค่าเฉลี่ยผลผลิตของพ่อต่อต้าน}}{\text{ค่าเฉลี่ยของพ่อต่อต้าน}} \times 100\%$$

% heterosis ของความเผ็ด =

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ยความเผ็ดของลูกผสม} - \text{ค่าเฉลี่ยความเผ็ดของสายพันธุ์พ่อ}}{\text{ค่าความเผ็ดของสายพันธุ์พ่อ}} \times 100\%$$

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 คัดเลือกสายพันธุ์พ่อและผสมข้ามเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1

การปลูกเพื่อเปรียบเทียบพันธุ์พริกผสมเปิด 8 สายพันธุ์ มีลักษณะทางพืชสวนดังนี้ สีส้มอ่อนสีเขียว ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 พจ. 2-2-1-1 พจ. 25-1-1-1

และ พจ. 27-1-2-1 สีส้มอ่อนสีเหลือง ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 4-1-1-1 พจ. 6-1-1-1 และ พจ. 07 สีส้มอ่อนสีเขียวเข้ม ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 06 สีส้มแก่สีเขียวเข้ม ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 พจ. 2-2-1-1 พจ. 25-1-1-1 และ พจ. 27-1-2-1 สีส้มแก่สีเหลือง ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 4-1-1-1 พจ. 6-1-1-1 และ พจ. 07 สีส้มแก่สีเขียวเข้ม ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 06 ความยาวของผลของพันธุ์ที่ทดลองมีค่าอยู่ระหว่าง 12.1-15.4 เซนติเมตร (ตารางที่ 1) ความกว้างของผลอยู่ระหว่าง 1.83-2.13 เซนติเมตร ความสูงของต้นอยู่ในระหว่าง 65.33-85.00 เซนติเมตร ความกว้างของทรงพุ่มอยู่ในระหว่าง 62.67-71.67 เซนติเมตร ความยาวและความกว้างของผล ความสูงของต้นและความกว้างของทรงพุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทางด้านลักษณะของทรงพุ่ม ทรงพุ่มแน่น ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 2-2-1-1 พจ. 4-1-1-1 พจ. 5-3-1-1 พจ. 6-1-1-1 และ พจ. 07 ต้นเตี้ยและแผ่กิ่งก้านสาขา ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 06 ทรงพุ่มสูง ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 25-1-1-1 และ พจ. 27-1-2-1 การติดผลสูง ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 4-1-1-1 พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 06 การติดผลปานกลาง ได้แก่ สายพันธุ์ พจ. 2-2-1-1 พจ. 6-1-1-1 พจ. 07 พจ. 25-1-1-1 และ พจ. 27-1-2-1 ลักษณะของผลทั้ง 8 สายพันธุ์ มีลักษณะผลยาว ก้านผลห้อยลง รสเผ็ดปานกลางและเกษตรกรผู้ปกติ (male fertile) (ตารางที่ 1) น้ำหนักผลผลิตพริกทั้ง 8 สายพันธุ์ ให้น้ำหนักผลผลิตในช่วง 4,318 - 8,239 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) การหาปริมาณสารแคปไซซินโดยคนชิม จำนวน 10 คน มีระดับคะแนนความเผ็ดเฉลี่ยตั้งแต่ 0 - 5.2 พันธุ์ที่มีระดับคะแนนความเผ็ดสูงที่สุดคือสายพันธุ์ พจ. 25-1-1-1 เท่ากับ 5.2 และสายพันธุ์ พจ. 06 มีระดับคะแนนความเผ็ดต่ำที่สุดหรือไม่เผ็ดเลย ซึ่งมีค่าเป็น 0 (ตารางที่ 2) และการหาปริมาณสารแคปไซซินโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่าค่าความเผ็ดมีค่าระหว่าง 8,585 - 13,030 Scoville unit ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2) พันธุ์ที่มีความเผ็ดสูงที่สุดคือ สายพันธุ์ พจ. 4-1-1-1 เท่ากับ 13,030 Scoville unit และสายพันธุ์ พจ. 2-2-1-1 มีค่าความเผ็ดต่ำที่สุด 8,585 Scoville unit ตามลำดับ ซึ่งการทดสอบความเผ็ดโดยคนชิม ให้ผลสอดคล้องกับวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

Table 1 Horticultural characteristics of male parental lines.

Horticultural characteristic	Plant growth habit	Plant height (cm)	Plant width (cm)	Male sterility	Fruit set	Fruit color in immature stage	Fruit color in mature stage	Fruit position	Fruit length (cm)	Fruit width (cm)
Line										
PG. 2-2-1-1	compact	72.67	71.67	absent	intermediate	green	green	declining	12.10	1.90
PG. 4-1-1-1	compact	75.67	69.00	absent	high	yellow	yellow	declining	15.00	2.13
PG. 5-3-1-1	compact	71.33	66.67	absent	high	green	green	declining	15.33	2.11
PG. 6-1-1-1	erect	79.67	62.67	absent	intermediate	yellow	yellow	declining	15.40	1.89
PG. 06	branch	63.33	65.33	absent	high	black	black	declining	13.30	1.83
						green	green			
PG. 07	compact	75.67	69.33	absent	intermediate	yellow	yellow	declining	14.96	2.13
PG. 25-1-1-1	erect	85.00	62.67	absent	intermediate	green	green	declining	13.89	2.01
PG. 27-1-2-1	compact	80.67	61.67	absent	intermediate	green	green	declining	12.10	1.90
F-test	-	ns	ns	-	-	-	-	-	ns	ns
CV (%)	-	13.01	14.06	-	-	-	-	-	8.43	19.63

ns = not significant difference

Table 2 Yield, capsaicin content and pungency levels by panel test of male parental lines.

Line	Yield (Kg/rai)	Capsaicin content/fruit weight (Scoville unit) ^{1/}	Panel test
PG. 4-1-1-1	8,239	13,030 a	3.4
PG. 06	6,600	12,130 a	4.0
PG. 6-1-1-1	5,883	10,550 b	3.8
PG. 5-3-1-1	5,708	9,790 bc	0
PG. 25-1-1-1	4,970	9,645 bcd	5.2
PG. 07	4,831	9,230 cd	2.1
PG. 27-1-2-1	4,319	8,610 d	1.8
PG. 2-2-1-1	4,318	8,585 d	1.8
LSD _{.05}	ns	1,050	-
CV(%)	48.88	5.88	-

^{1/}Same letters within column are not significantly difference at P ≤ .05 by least significant difference.

จากการคัดเลือกพริกทั้ง 8 สายพันธุ์ พันธุ์ที่เหมาะสม
สำหรับทำน้ำพริกหนุ่มและนำมาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ มีอยู่ 2
สายพันธุ์ คือ พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 25-1-1-1 (ภาพที่ 1)

การทดลองที่ 2 ปลุกทดสอบลูกผสมชั่วที่ 1
คู่ผสมที่ให้ผลผลิตของลูกผสมชั่วที่ 1 ดีที่สุดใน
กลุ่มลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ 2735BC₂#



Figure 1 Parental lines, commercial varieties and F₁ hybrid varieties of chili.

- 1 = PG. 5-3-1-1 2 = PG. 25-1-1-1 3 = Maeping 80 4 = Chakrapat
5 = 2740BC₂ # 10-3-3 × PG. 5-3-1-1 6 = 2740BC₂ # 10-3-3 × PG. 25-1-1-1
7 = 2735BC₂ # 14-2-1 × PG. 5-3-1-1 8 = 2735BC₂ # 14-2-1 × PG. 25-1-1-1
9 = 2735BC₂ # 16-1-4 × PG. 5-3-1-1 10 = 2735BC₂ # 16-1-4 × PG. 25-1-1-1

16-1-4 × พจ. 5-3-1-1 ซึ่งให้ผลผลิต 1,538.47 กิโลกรัม/ไร่ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1) แต่ให้ผลผลิตไม่แตกต่างกันทางสถิติกับพันธุ์จักรพรรดิ (2,076.81 กิโลกรัม/ไร่) พันธุ์แม่โป่ง 80 (1,346.81 กิโลกรัม/ไร่) และสายพันธุ์พจ. 5-3-1-1 (1,376.87 กิโลกรัม/ไร่) และเมื่อสายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 เป็นพ่อพันธุ์ ให้ลูกผสมที่มีผลผลิตสูง (1,081.13 – 1,538.47 กิโลกรัม/ไร่) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์พจ. 25-1-1-1 เมื่อเป็นพันธุ์พ่อ ให้ลูกผสมชั่วที่ 1 ให้ผลผลิตในช่วง 545.06 – 987.56 กิโลกรัม/ไร่ ซึ่งบางคู่ผสมผลผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์พจ. 25-1-1-1 ทางด้านความดีเด่นของลูกผสม (heterosis) ในด้านผลผลิต คู่ผสมของ 2735BC₂#16-1-4 × พจ. 5-3-1-1 มีเปอร์เซ็นต์ความดีเด่นของลูกผสมเท่ากับ 11.76 % สูงกว่าคู่ผสมอื่นอีก 5 คู่ผสม การหาปริมาณสารแคปไซซินเฉลี่ยต่อน้ำหนักผล 1 กรัมของสายพันธุ์พริกที่ทดสอบทั้งหมดอยู่ในช่วง 6,875 – 7,318 Scoville unit (ตารางที่ 3) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และความดีเด่นของลูกผสมด้านความเผ็ดอยู่ในช่วง -0.43 ถึง 5.37 โดยคู่ผสมของ 2735BC₂#14-2-1 × พจ. 25-1-1-1 จะสูงกว่าพันธุ์อื่น ๆ เท่ากับ 5.37 % และการวัดค่าความเผ็ดโดยใช้คนชิม 10 คน คู่ผสมของ 2735BC₂#16-1-4 × พจ. 25-1-1-1 เท่ากับ 6 มีค่าใกล้เคียงกับพันธุ์จักรพรรดิ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.1 (ตารางที่ 3)

วิจารณ์

จากการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อจากพริกทั้ง 8 พันธุ์ โดยการคัดเลือกจากลักษณะทางพืชสวน มีความเผ็ดปานกลางและให้ผลผลิตสูง จากการทดลองพบว่าน้ำหนักผลผลิต ความเผ็ด ความสูงต้น ความกว้างทรงพุ่ม ความยาวผลและความกว้างผล ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์พจ. 5-3-1-1 ที่มีผลแก่สีเขียว และมีปริมาณสารแคปไซซินอยู่ในช่วง 8,500 – 9,645 Scoville unit ซึ่งเป็นค่าความเผ็ดที่อยู่ในระดับปานกลาง และพันธุ์ที่ตรงตามความต้องการคือ สายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 25-1-1-1 ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 จะให้ผลผลิตไม่ต่างจากพันธุ์อื่น ๆ จากการปลูกทดสอบครั้งนี้ แต่จากรายงานของกรมวิชาการเกษตร (2548) ว่า ศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตรได้นำพริกสายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 ไปปลูกทดสอบ 3 สถานี พบว่าที่สถานีทดลองพืชสวนฝาง และกาญจนบุรี พริกชี้ฟ้าผลสีเขียวสายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 ให้ผลผลิตสูง สายพันธุ์ที่คัดเลือกทั้ง 2 พันธุ์ มีดอกเกษตรเพศผู้ปกติ ผลยาวไม่ต่ำกว่า 14 เซนติเมตร ทรงพุ่มสูงตั้งแต่ 71 เซนติเมตรขึ้นไปและมีความกว้างของทรงพุ่มอยู่ในช่วง 62-67 เซนติเมตร ซึ่งเป็นการคัดเลือกเช่นเดียวกับการทดลองของกฤษฎา (2544) ที่คัดเลือกต้นที่มีดอก

Table 3 Yield, capsaicin content and pungency levels by panel test of F_1 hybrids, male parental lines and commercial F_1 hybrid varieties of chili.

Variety and Line	Yield ^{1/} (kg/rai)	Yield/plant ^{1/} (g/pt)	Heterosis (%)	Capsaicin content/ fruit weight (Scoville unit)	Heterosis (%)	Panel test
F_1 hybrid						
2735BC ₂ #16-1-4×PG.5-3-1-1	1,538.47 ab	240.39 ab	11.76	6,875	-0.43	2.6
2735BC ₂ #14-2-1×PG.5-3-1-1	1,083.90 bc	170.42 bc	-21.25	6,935	0.43	3.8
2740BC ₂ #10-3-3×PG.5-3-1-1	1,081.13 bc	173.24 bc	-21.48	6,975	1.01	5.2
2740BC ₂ #10-3-3×PG.25-1-1-1	87.56 bc	154.31 bc	-17.24	6,975	0.43	4.8
2735BC ₂ #16-1-4×PG.25-1-1-1	905.39 bc	141.47 bc	-17.65	6,965	0.29	6
2735BC ₂ #14-2-1×PG.25-1-1-1	545.06 c	85.17 c	-52.92	7,318	5.37	3.7
Male parental line						
PG. 5-3-1-1	1,376.87 b	215.44 b	-	6,905	-	2.2
PG. 25-1-1-1	1,157.91 bc	171.90 bc	-	6,945	-	1.3
Commercial variety						
Maeping 80	1,346.81 b	210.44 b	-	6,950	-	0
Chakrapat	2,076.81 a	324.82 a	-	7,045	-	6.1
LSD _{.05}	605.7	94.64	-	ns	-	-
CV(%)	29.19	29.19	-	3.57	-	-

^{1/}Same letter within column are not significantly difference at $P \leq .05$ by least significant difference.

เกษตรกรผู้ปลูก แต่การคัดเลือกความยาวผล จะเลือกผลยาวไม่ต่ำกว่า 15 เซนติเมตร ความสูงของต้นไม่ต่ำกว่า 80 เซนติเมตร และความกว้างของทรงพุ่มอยู่ในช่วง 50 – 60 เซนติเมตร

จากการผสมพันธุ์แม่ที่เป็นหมัน 3 พันธุ์กับพันธุ์พ่อ 2 พันธุ์ ได้ลูกผสมทั้งหมด 6 คู่ผสม พบว่ามีพ่อและแม่พันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาสร้างลูกผสม คือคู่ผสมของ 2735BC₂#16-1-4 × พจ. 5-3-1-1 เนื่องจากให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากพันธุ์พ่อและพันธุ์การคำทั้ง 2 พันธุ์ และลูกผสมนี้ให้ผลผลิตต่อต้นสูงถึง 240.40 กรัม/ต้น ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าลูกผสมอื่น ๆ จากการทดลองของ Damke and Kawarkhe (1996) ซึ่งนำสายพันธุ์แท้ 83077-1 ผสมกับ 83-163-8 ลูกผสมให้น้ำหนักผลผลิตเฉลี่ย 100-120 กรัม/ต้น สายพันธุ์พ่อ พจ. 25-1-1-1 มีคู่ผสมบางคู่ที่ให้ผลผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์พ่อและพันธุ์การคำ นอกจากนี้

ลูกผสมชั่วที่ 1 2735BC₂#16-1-4 × พจ. 5-3-1-1 มีความดีเด่นของลูกผสมสูงที่สุดในกลุ่มลูกผสมด้วยกันและมีค่าเป็นบวกเพียงคู่ผสมเดียวเท่านั้น ทำให้สรุปได้ว่า เป็นคู่ผสมที่มีความสามารถในการรวมตัวเฉพาะสูง ให้เปอร์เซ็นต์ความดีเด่นของลูกผสมเป็นบวก ส่วนคู่ผสมอื่นที่มีความสามารถในการรวมตัวต่ำกว่า และมีค่าความดีเด่นของลูกผสมเป็นลบ จะเห็นว่าการทดลองนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Ahmed *et al.* (1999) ที่พบว่าลูกผสมจาก Shlimar Long x SPE-1 มีความดีเด่นของลูกผสมด้านผลผลิตดีที่สุดและมีการแสดงออกของ sca ที่ดี และการทดลองของ Berke (2000) ที่พบว่าลูกผสมมีการแสดงออกถึงความดีเด่นของลูกผสม ลูกผสมมีคุณภาพสูงและใช้ลักษณะการเป็นหมันโดยยีนและไฮโทพลาซึมเป็นสายพันธุ์แม่

การหาปริมาณสารแคปไซซินต่อน้ำหนักผล 1 กรัม พบว่าพันธุ์ที่ทดสอบทั้งหมดไม่มีปัญหาด้านความเผ็ดเพราะปริมาณสารแคปไซซินไม่มีความแตกต่างกัน สามารถเลือกพันธุ์ไหนมาใช้ก็ได้ ซึ่งสายพันธุ์แม่นั้นได้พัฒนาความเผ็ดจนมีความคงที่แล้วจากงานทดลองของ กฤษณา (2544) สายพันธุ์พ่อก็มีปริมาณสารแคปไซซินใกล้เคียงกับสายพันธุ์แม่ แสดงว่าพันธุกรรมด้านความเผ็ดของพ่อกับแม่มีความใกล้ชิดกันและพันธุกรรมไม่แตกต่างกันมาก เมื่อนำมาผสมกันทำให้ปริมาณสารแคปไซซินของลูกผสมมีค่าไม่ต่างจากพ่อ ส่งผลให้ค่าความดีเด่นของลูกผสมด้านความเผ็ดมีค่าน้อย จากลักษณะนี้ แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารแคปไซซินของลูกผสมไม่แสดงลักษณะ dominant หรือ complete dominant และ over dominant ซึ่ง Ahmed and Pandey (2002) กับ Doshi and Shukla (2000) รายงานไว้ตรงกันว่า ลักษณะของยีนที่ควบคุมความเผ็ดเป็นปรากฏการณ์ของยีนแบบ additive gene action ที่ควบคุมด้วยยีนเด่นหลาย allele การที่ยีนควบคุมความเผ็ดเป็นแบบนี้ ทำให้หาค่าความดีเด่นของลูกผสมได้ยากหรือได้น้อยมาก เพราะ gene ของลูกจะอยู่บริเวณ mid parent (MP) ในการหาปริมาณสารแคปไซซินโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 750 นาโนเมตร ให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับการวัดระดับความเผ็ดโดยคนชิม ซึ่งพันธุ์ที่มีปริมาณแคปไซซินสูง ระดับความเผ็ดโดยคนชิมก็สูงเช่นกัน ในการหาปริมาณความเผ็ดนั้นควรจะหาควบคู่กันไปด้วยทั้ง 2 วิธีเพื่อความถูกต้องและแม่นยำมากขึ้น ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายน้อย และอีกวิธีที่ได้รับความนิยมมากในขณะนี้แต่มีค่าใช้จ่ายในการทดลองสูง ก็คือการหาปริมาณสารแคปไซซินโดยวิธี high liquid performance chromatography (HPLC)

สรุปผลการทดลอง

การรวบรวมพันธุ์พริกจากศูนย์วิจัยพืชสวน พิจิตร 8 สายพันธุ์ มี 2 สายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นสายพันธุ์พ่อ คือ สายพันธุ์ พจ. 5-3-1-1 และ พจ. 25-1-1-1

การเปรียบเทียบผลผลิต พบว่าลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ 2735BC₂#16-1-4 × พจ. 5-3-1-1 เป็นคู่ผสมที่ดีให้ผลผลิตสูง และมีความสามารถในการรวมตัวเฉพาะสูง ทำให้ค่าความดีเด่นของลูกผสมสูงกว่าลูกผสมคู่อื่น ๆ โดยสายพันธุ์พ่อ พจ. 5-3-1-1 ให้ลูกผสมมีผลผลิตสูงไม่แตกต่างกับสายพันธุ์พ่อและพันธุ์การค้า

การหาปริมาณสารแคปไซซิน โดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 750 นาโนเมตร พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และพันธุ์ลูกผสม 2735BC₂#14-2-1 × พจ. 25-1-1-1 มีความดีเด่นของลูกผสมของปริมาณสารแคปไซซินสูงกว่าพันธุ์ลูกผสมอื่น ๆ และการทดลองโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนคลีนแสงที่ 750 นาโนเมตรให้ผลการทดลองที่มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบระดับความเผ็ดโดยคนชิม

กิตติกรรมประกาศ

รศ.ดร. ดำเนิน กาละดี อาจารย์ประจำภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ผู้แนะนำการวิเคราะห์และแก้ไขเอกสาร

คุณจรัญ ดิษฐ์ไชยวงศ์ และ คุณนรินทร์ พูลเพิ่ม นักวิชาการประจำศูนย์วิจัยพืชสวนพิจิตร จังหวัดพิจิตร ที่มอบเมล็ดพันธุ์พริกให้สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ วชิรบรรจง. 2545. การศึกษาความเป็นหมันในพริกเผ็ด (*Capsicum annuum* L.). ปัญหาพิเศษ. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 40 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2548. ฐานความรู้ด้านพืชกรรมวิชาการเกษตร. (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/pl_data/02_LOCAL/oa_rd4/chili/body.html (15 กรกฎาคม 2548).

- กฤษฎา สุขวิวัฒน์. 2544. การพัฒนาพ่อแม่พันธุ์ลูกผสม
ข้าวที่หนึ่งของพริกเผ็ด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
90 หน้า.
- ดำเนิน กาละดี. 2545. เทคโนโลยีการปรับปรุงพันธุ์พืช.
มิ่งเมือง, เชียงใหม่. 256 หน้า.
- มณีรัตน์ นิกรพันธุ์. 2541. พริก. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
196 หน้า.
- Ahmed, N., M. I. Tanki and J. Nayeema. 1999.
Heterosis and combining ability studies in
hot pepper (*Capsicum annum* L.). Applied
Biological Research 1(1): 11-14.
- Ahmed, Z. and V. Pandey. 2002. Heterosis and
combining ability in diallel crosses of sweet
pepper (*Capsicum annum* L.). Vegetable
Science 29(1): 66-67.
- Basset, M. J. 1986. Breeding Vegetable Crops. AVI
Publishing Company, Inc., Westport,
Connecticut. 584 pp.
- Berke, T. G. 2000. Hybrid seed production in
Capsicum. Journal of New Seeds 1(3/4):
49-67.
- Bosland, P. W., J. Iglesias and M.M. Gonzales. 1993.
'Numex Sweet' paprika chile. Hortscience
28(8): 860-861.
- Damke, M. M. and V. J. Kawarkhe. 1996. "Surakta"
(AKC 79-18) an improved chili variety. Plant
Breeding Abstracts 67(9).
- Doshi, K. M. and P. T. Shukla. 2000. Genetic of yield
and its components in chilli (*Capsicum
annuum* L.). Capsicum and Eggplant
Newsletter 19: 78-81.
- Nikolova, V., V. Todorova, S. Daskalov, Y.
Todorov and V. Stoeva. 2001. Pollen fertility
of pepper cultivars and their hybrids on
male sterility basis. Capsicum and Eggplant
Newsletter 20: 50-52.
- Patel, J. A., M. J. Patel, A. S. Bhanvadia, R. R.
Acharya and M. K. Bhalala. 2001. Extent of
natural cross pollination with GMS lines in
chilli (*Capsicum annum* L.). Capsicum and
Eggplant Newsletter 20: 35-37.
- Purseglove, J. W. 1968. Tropical Crops:
Dicotyledons. Vol. 2. Longmans, London.
719 pp.
-

การเพิ่มความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน

โดยใช้กรดแอบซิสสิก

Enhancing the Viability of Sweet Pepper Synthetic Seed Using Absciscic Acid

ปิยชัย เปรมวารานนท์^{1/}, สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์^{1/} และสุชาดา เวียรศิลป์^{1/}
Piyachai Preamvaranon^{1/}, Sa-nguansak Thanapornpoonpong^{1/} and Suchada Vearasilp^{1/}

Abstract: The somatic embryos obtained from callus culture were treated with 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 1 mg/l ABA in MS medium (maturation formula) for 21 days. Then the seed encapsulation and the synthetic seed dehydration were pursued until the seeds lost 80 percent of their moisture contents. The results showed that the survival percentages were 33, 36, 47, 43, 55, 73, 83 and 37, respectively. Therefore, somatic embryos treated with 0.5 mg/l ABA improved survival rate of synthetic seeds dramatically. The ABA treated somatic embryos encapsulated with 3 percent w/v sodium alginate and 75 mM calcium chloride could prolong their germination for 6 weeks after storage at 25±2°C, with 16 hours photoperiod. The 6 weeks stored synthetic seeds had 63% survival rate after 6 days planting in MS media. The experimental results suggested the possibility of ABA for germination and storage improvement of dry sweet pepper synthetic seeds.

Keywords: Sweet pepper, synthetic seed, absciscic acid, seed encapsulation

บทคัดย่อ: เมื่อเพาะเลี้ยงแคลลัสพริกหวานจนได้ไซมาติกเอ็มบริโอแล้ว นำมาทดสอบด้วย ABA ความเข้มข้น 0 0.05 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 และ 1 มก./ล. ในอาหาร MS สูตรพัฒนาเอ็มบริโอให้แก่งเป็นเวลา 21 วัน ผลิตเป็นเมล็ดสังเคราะห์ และทำการระเหยนํ้าออกจากเมล็ดสังเคราะห์จนสูญเสียความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้คือ เมล็ดสังเคราะห์ที่มีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต 33 36 47 43 55 73 83 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นการใช้ ABA 0.5 มก./ล. ในการเพาะเลี้ยงไซมาติกเอ็มบริโอ จะช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเมล็ดสังเคราะห์ได้มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด หลังจากนั้นนำไซมาติกเอ็มบริโอที่ผ่านการชักนำด้วย ABA ดังกล่าว มาเคลือบด้วย sodium alginate 3 %w/v และ calcium chloride 75 mM แล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 25±2 °C สภาพแสง 16 ชั่วโมง พบว่าสามารถเก็บรักษาเมล็ดสังเคราะห์ได้ยาวนานถึง 6

^{1/}ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200.

^{1/}Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

สัปดาห์ และเมื่อนำเมล็ดสังเคราะห์ที่เก็บรักษาไว้ 6 สัปดาห์ มาปลูกในอาหาร MS จะใช้ระยะเวลาในการงอก 6 วัน เมล็ดสังเคราะห์พริกหวานที่ได้จากการทดลองนี้ ยังคงมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงถึง 63 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองได้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการช่วยเพิ่มความมีชีวิต และความสามารถในการเก็บรักษาให้สูงขึ้นในเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานแบบแห้งโดยใช้ ABA

คำสำคัญ: พริกหวาน เมล็ดสังเคราะห์ กรดแอบซิสสิก การเคลือบเมล็ด

Introduction

F1 hybrid of sweet peppers are not only expensive, but they are also produced in low number from many crosses due to problems of inter specific incompatibility and F1 hybrid sterility. (Harini and Sita, 1993). Moist synthetic seeds had many weak points. One of those was; they should be stored in the condition of low temperature, which was problematic in storage. Moreover, the seeds had short storage period while their conversion rate was also low. There was high respiration rate of somatic embryos in hydrogel, causing moist synthetic seeds to dry quickly in room temperature (Redenbaugh *et al.*, 1987). It was found that dry synthetic *Brassica* spp. seed production with ABA to induce desiccation tolerance before dehydration could enhance the longer synthetic seeds storage up to 6 months without controlling temperature and moisture during the storage. It could also be germinated in soil and it had seedling comparing to moist somatic embryos (Takahata *et al.*, 1993). ABA took role in somatic embryo development by defending precocious germination, inducing desiccation tolerance and deteriorating chlorophyll in order to decrease oxygen production (Elstner, 1982). Thus, the objectives of this research were; a) to use abscisic acid (ABA) induced desiccation tolerance of sweet pepper, b) to improve sweet pepper synthetic seed production technique for higher rate

of germination and viability and c) to improve technique for prolonging sweet pepper synthetic seeds storage.

Materials and Methods

The protocol for indirect somatic embryogenesis of sweet pepper from mature zygotic embryos had been already established (Buyukalaca and Mavituna, 1996). This study, therefore, proceeded further experiments using somatic embryos as followed:

Experiment 1: Analyzing appropriate growth stage of somatic embryos in induce desiccation tolerance by using ABA.

Somatic embryos at late torpedo stage were transferred to 50 ml MS liquid medium which was the maturation formula containing 0.5 mg/l ABA for 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 and 25 days in the dark, placing on a rotary shaker at 100 rpm at 25 ± 2 °C (Buyukalaca and Mavituna, 1996). Synthetic seeds were then produced from somatic embryos before dehydration was pursued until the seeds lost 80% of their moisture contents. The next process was to test the survival rate and speed of germination by culturing at 25 ± 2 °C and 16 hours/day photoperiod for one week. The survival percentage and speed of germination were recorded. This process was repeated three times, ten synthetic seeds for each.

Experiment 2: Analyzing appropriate ABA concentration to induce desiccation tolerance before synthetic seeds production.

Somatic embryos at late torpedo stage were transferred to 50 ml MS liquid medium which was the maturation formula containing ABA 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 1.0 mg/l concentration, respectively for 21 days in the dark, placing on a rotary shaker at 100 rpm at 25 ± 2 °C. Synthetic seeds were then produced from somatic embryos before dehydration was pursued until the seeds lost 80% of their moisture contents. The next process was to test the survival rate and speed of germination by culturing at 25 ± 2 °C and 16 hours/day photoperiod for one week. The survival percentage and speed of germination were recorded. This process was repeated three times, ten synthetic seeds for each.

Experiment 3: Testing synthetic seeds germination after storage.

Somatic embryos from the maturation medium containing 0.5 mg/l ABA for 21 days in the dark, placing on a rotary shaker at 100 rpm at 25 ± 2 °C. Synthetic seeds were then produced from somatic embryos before dehydration was pursued until the seeds lost 80% of their moisture contents. They were stored in 250 ml Erlenmeyer flask, 5 seeds for each then sealed with parafilm storage at 25 ± 2 °C and 16 hours/day photoperiod for 0, 1, 2, 3, 4, 6 and 8 weeks, respectively. After that, those seeds, which were stored in different length of storage, were rehydrated and the final process was to test the survival rate and speed of germination by culturing at 25 ± 2 °C and 16 hours/day photoperiod for one week. The survival percentage and speed of germination were recorded. This process was repeated three times, ten synthetic seeds for each.

Statistical analysis

All experiments were arranged in a completely randomized design with 3 replicates per treatment (10 embryos/replicate). Data was analyzed using analysis of variance and mean comparisons made by protected least significant difference at the 5% level of probability.

Results and Discussion

The results from experiment 1 was; Culturing 21-day-old embryos was found to 93 % survival of all seeds while there were only 4 % of abnormal seedling. The germination took only 3 days and its germination percentage decreased in more than 21-day-old embryos, which could be because the longer the accumulation of ABA, the more stimulation of somatic embryos into dormancy stage (Table 1).

The results from experiment 2 suggested that increasing ABA concentration gradually could increase survival percentage. On the other hand, seeds were variable which might due to the effect of ABA to enzyme activity in some plants. 0.5 mg/l ABA would lead to as much as 83% synthetic seeds survival while there were only 4 % of abnormal seedling, comparing to survival without ABA which synthetic seeds germinated only 33% and had as much as 13 % abnormal seedling. However, survival percentage would decrease again when the concentration of ABA was more than 0.5 mg/l because the very high ABA concentration resulted more in dormancy than inducing desiccation tolerance (Table 2)

The results from experiment 3 suggested that survival percentage would decrease every week and so as the speed of germination. However, the

Table 1 Result of growth period on synthetic seed survival percentage and speed of germination after dehydration was pursued until seeds lost 80% of their moisture contents.

Growth period (day)	% Survival (Normal seedling)	Abnormal seedling (%)	Speed of germination (day)
3	0 ^{h 1/}	0 ^g	-
6	0 ^h	0 ^g	-
9	17 ^{fg}	3 ^{fg}	7 ^d
12	14 ^g	16 ^{bc}	6 ^c
15	46 ^e	17 ^{ab}	6 ^c
18	76 ^{bc}	4 ^{ef}	4 ^b
21	93 ^a	4 ^{ef}	3 ^a
24	73 ^c	10 ^d	4 ^b
25	56 ^d	14 ^{cd}	6 ^c
CV (%)	16.73	13.18	8.84

^{1/}Numbers with the English alphabets in the same column represents the statistic significantly different ($P < 0.05$).

Table 2 Effect of ABA concentration on synthetic seed survival percentage and speed of germination after dehydration was pursued until seeds lost 80% of their moisture contents.

ABA (mg/l)	% Survival (Normal seedling)	Abnormal seedling(%)	Speed of germination (day)
0	33 ^{h 1/}	13 ^{bc}	3 ^a
0.05	36 ^{gh}	10 ^{cd}	3 ^a
0.1	47 ^{de}	6 ^{ef}	4 ^b
0.2	43 ^e	10 ^{cd}	4 ^b
0.3	57 ^c	9 ^{de}	4 ^b
0.4	73 ^b	4 ^f	4 ^b
0.5	83 ^a	4 ^f	4 ^b
1.0	37 ^{fg}	16 ^{ab}	5 ^c
CV (%)	13.61	14.22	7.29

^{1/}Numbers with the English alphabets in the same column represents the statistic significantly different ($P < 0.05$).

survival percentage would decrease obviously in the eighth day of storage. The survival percentage decreased to 43% while there were 10% abnormal seedling at that time. Considering the result in Table 3, the most suitable synthetic seed storage period

was 6 weeks with 63 % survival and 7 % abnormal seedling. This was considered to be the satisfied percentage. Nevertheless, Binzel *et al.* (1996) suggested that the viability would increase more if applying 3.8 μ M ABA before encapsulation with

Table 3 Result of storage time on inducing desiccation tolerance synthetic seed germination percentage and speed of germination after dehydration was pursued until seeds lost 80% of their moisture contents.

Storage time (week)	% Survival (Normal seedling)	Abnormal seedling(%)	Speed of germination (day)
0	93 ^{a 1/}	3 ^d	3 ^a
1	83 ^b	7 ^{cd}	3 ^a
2	83 ^b	3 ^d	3 ^a
3	67 ^{cd}	13 ^{ab}	4 ^b
4	66 ^{de}	7 ^{cd}	5 ^c
6	63 ^e	7 ^{cd}	6 ^d
8	43 ^f	10 ^{bc}	6 ^d
CV (%)	10.13	13.82	6.52

^{1/}Numbers with the English alphabets in the same column represents the statistic significantly different ($P < 0.05$).

sodium alginate and dehydration. This led to 57 % synthetic seed survival. The storage by inducing desiccation tolerance with 0.5 mg/l ABA was done for 1, 2 and 3 weeks whose results were 48, 47 and 32 % of germination, respectively. Therefore, this result demonstrates the possibility of inducing desiccation tolerance by applying ABA into somatic embryos, conforming with Takahata *et al.* (1993) who could produce the most inducing desiccation tolerance when applying 100 μ M ABA, developing into 27-48 % plantlets.

Conclusion

Use of ABA 0.5 mg/l in dried synthetic seeds production did improved their survival rate dramatically, which was higher in percentage than previous researches. This technique was also able to prolong synthetic seed at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, resulting in low expense for the storage. Moreover, this technique can further be applied for other plants in order to increase yields in limited crop fields.

References

- Binzel, M.L., N. Sankhla, J. Sangeeta and S. Daksha.1996 . Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Cell Reports 15: 536-540.
- Buyukalaca, S. and F. Mavituna. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 227-235.
- Elstner, E.F. 1982. Oxygen Activation and Oxygen Toxicity. Annual Review Plant Physiology 33: 73-96.
- Harini, I. and G.L. Sita. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*Capsicum annuum* L.). Plant Science 89: 107-112.
- Redenbaugh, K., D. Slade, P. Viss and J.A. Fujii. 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. HortScience 22: 803-809.

Takahata, Y., D.C.W. Brown, W.A. Keller and N. Kaizuma. 1993. Dry artificial seeds and desiccation tolerance induction in microspore-derived embryos of broccoli. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 121-129.

การพัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดสังเคราะห์พริกหวาน

Development of Sweet Pepper Synthetic Seed Production Technique

สุชาดา เวียรศิลป์^{1/}, ปิยชัย เปรมวรานนท์^{1/} และ สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์^{1/}
Suchada Vearasilp^{1/}, Piyachai Preamvaranon^{1/} and Sa-nguansak Thanapornpoonpong^{1/}

Abstract: This research demonstrates the improvement of sweet pepper synthetic seed production technique by using somatic embryos from indirect somatic embryogenesis method of mature zygotic embryo explants. The seeds were cultured in developed MS liquid medium whose nutrient concentration and growth regulators were modified in order for high embryogenic frequent callus, which could be transformed into strong somatic embryos. Mature somatic embryos were encapsulated in calcium alginate gel using different concentration of sodium alginate 2, 3, 4, 5 and 6% w/v and calcium chloride 25, 50, 75 and 100 mM. After having synthetic seeds from this process, the synthetic seeds dehydration were pursued until they lost 80% of their moisture contents. The experimental results suggested that ; encapsulation with 3% sodium alginate and 75 mM calcium chloride was most appropriate in dry sweet pepper synthetic seed production. The survival reached 87% and calcium alginate gel in seed encapsulation was stable bead rigidity and shape after dehydration until losing 80% of their moisture contents. Moreover, synthetic seeds will have high flexibility and germinate within 3 days.

Keywords: Callus, sweet pepper, synthetic seed, seed encapsulation

บทคัดย่อ: การศึกษานี้นำเสนอการพัฒนาเทคนิคการผลิตเมล็ดสังเคราะห์พริกหวานโดยใช้ไซมาติกเอ็มบริโอที่ได้จากกระบวนการ indirect somatic embryogenesis ของเอ็มบริโอที่เจริญจากไซโกตที่เจริญเติบโตเต็มที่ โดยการนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS ซึ่งมีการปรับปรุงความเข้มข้นของสารอาหาร และสารกระตุ้นการเจริญเติบโต เพื่อให้ได้แคลลัสที่มีลักษณะ high embryogenic frequent ซึ่งสามารถพัฒนาเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นไซมาติกเอ็มบริโอที่แข็งแรงได้ นำไซมาติกเอ็มบริโอที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วมาเคลือบใน calcium alginate gel โดยใช้ความเข้มข้นที่ระดับต่าง ๆ กันของสารละลาย sodium alginate ที่มีความเข้มข้น 2 3 4 5 และ 6 % w/v และสารละลาย calcium chloride ที่มีความเข้มข้น 25 50 75 และ 100 mM หลังจากนั้นนำเมล็ดสังเคราะห์ที่ได้จากกระบวนการนี้มาทำการระเหยน้ำออกจนมีระดับการสูญเสีย 80 % จากผลการทดลองได้ชี้ให้เห็นว่าการเคลือบไซมาติกเอ็มบริโอด้วยสารละลาย sodium alginate 3 % w/v และสารละลาย calcium chloride 75 mM เหมาะสมที่สุดในการผลิตเมล็ด

^{1/}ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200.

^{1/}Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

สังเคราะห์แบบแห้งของพริกหวาน โดยมีเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตสูงถึง 87 % และ calcium alginate gel ที่ใช้ในการเคลือบเมล็ดจะมีความอยู่ตัวสูง และไม่เสียรูปร่างหลังจากทำการระเหยนํ้าออกจากเมล็ดสังเคราะห์จนมีระดับการสูญเสียนํ้า 80 % นอกจากนั้นเมล็ดสังเคราะห์ที่ได้จะมีความยืดหยุ่นสูง และสามารถงอกได้ภายในระยะเวลา 3 วัน

คำสำคัญ: แคลลัส พริกหวาน เมล็ดสังเคราะห์ การเคลือบเมล็ด

Introduction

F1 hybrid production of sweet peppers are limited by many factors. It is not only produced in low number from many crosses due to problems of interspecific incompatibility and F1 hybrid sterility, but it is also expensive (Harini and Sita, 1993). Foure *et al.* (1997) found that sodium alginate 4% w/v would inhibit the somatic embryos germination while using 1, 2 and 3% w/v concentration of sodium alginate helped much in improving somatic embryo germination rate. However, 1% w/v concentration of alginate would bring about weak encapsulation of synthetic seeds which made them difficult to be transported. Moist synthetic seeds had many weak points. One of those was; they should be stored in low temperature condition, which was problematic in storage. Moreover, the seeds had short storage period while their conversion rate was also low. Thus, the objectives of this research were; a) to find out the most efficient process in producing dried synthetic seeds and, b) to improve sweet pepper synthetic seeds production technique for higher rate of germination and viability.

Materials and Methods

The protocol for indirect somatic embryogenesis of sweet pepper had been already established (Buyukalaca and Mavituna, 1996), following this protocol.

Plant material

The surface of mature seeds of *Capsicum annum* var. Ace were sterilized by soaking in 70 % (v/v) ethanol solution for 2 minutes, then they were immersed in 10 % (v/v) clorox for 15 minutes and finally rinsed three times with sterile distilled water for 24 hours. Embryo explants were aseptically removed from sterilized seeds.

Somatic embryogenesis

Five mature zygotic embryo explants were placed on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) in a 50x80 mm sterile glass bottle which was sealed with parafilm for embryogenic callus formation. Zygotic embryos were kept at 25 ± 2 °C under continuous illumination provided by white fluorescent lamps. One-month-old 1-1.2 g embryogenic callus was suspended in 50 ml MS medium containing 1 mg/l 2, 4 – D in a 250 ml Erlenmayer flask and placed on a rotary shaker at 100 rpm for further development. Embryogenic suspension cultures were subcultures every two weeks for two months. The embryogenic suspension cultures were transferred as inoculum to the bioreactor for further growth for two weeks. The medium of the suspension cultures was replaced by liquid KNO_3 – free MS medium containing 2 mg/l 2, 4 – D and 6 mg/l K-citrate for 1 month for pretreatment. The medium of the pre-treated cells was replaced with the basal medium modified by reducing NH_4NO_3 concentration from 20 mM to 10 mM and including 6 g/l L-proline

for all the stages of embryogenesis, from globular to torpedo shape, which took 1 month. After embryo formation, half-strength basal medium containing 3 % sucrose was used for embryo maturation.

Synthetic seeds production

21-day-old somatic embryos from the maturation medium were isolated by sieving through a 0.3 mm stainless steel filter and transferred to sterile distilled water. Sodium alginate was added in the range of 2-6% w/v to the MS medium with 2 g/l sucrose, 1 mg/l IAA, 1mg/l KIN and autoclaved. CaCl_2 solutions at 25, 50, 75 and 100 mM concentrations were prepared using basal MS medium with the same growth regulators as above and autoclaved. For complexing, somatic embryos were individually dipped in sodium alginate solution and then dropped into the magnetically stirred CaCl_2 solution for 10 minutes. After solidification, the beads, each containing a single somatic embryo, were removed and washed with sterile MS liquid medium. After that, dehydration were pursued by using silica gel until synthetic seeds lost 80% of their moisture contents. From this process, synthetic seeds with a single somatic embryo were chosen for testing the survival rate and speed of germination by culturing at 25 ± 2 °C and 16 hours/day photoperiod for one week. The survival percentage and speed of germination were recorded while the resistance force was measured by using the texture analyzer. This process was repeated three times, ten synthetic seeds for each time.

Conversion into plantlets

Encapsulated somatic embryos were germinated in *in vitro*. The *in vitro* conversion medium consisted of 20 ml MS medium with 3% sucrose and 0.8% agar in a glass bottle which was

incubated 25 ± 2 °C with 16 hours photoperiod provided by white fluorescent lamp. This process was repeated three times, ten synthetic seeds for each time.

Statistical analysis

All experiments were arranged in a completely randomized design with 3 replicates per treatment (10 embryos/replicate). Data was analyzed using analysis of variance and mean comparisons made by protected least significant difference at the 5% level of probability.

Results and Discussion

Indirect somatic embryogenesis of sweet pepper

Inducing callus from mature zygotic embryo explants brought about four types of callus; white-watery, brown-friable which were both nonembryogenic, green-compact with low embryogenic frequency and yellowish-nodular-friable with high embryogenic frequency (Figure 1) following Buyukalaca's and Mavituna's report in 1996.

High embryogenic frequency cultured in liquid MS medium modified by Buyukalaca and Mavituna (1996) for one month would developed into homogeneous cell suspension, composing with obvious small compact cells with cytoplasm and nucleus and high cell division rate (Figure 2)

After one month of the homogeneous cell suspension pretreatment, it was found that single cells had been enlarging. When transferring single cells into embryo initiation medium for one month, cells transformed into globular shape, heart shape and torpedo shape, respectively. (Figure 3)

In the late torpedo stage, somatic embryos were cultured in embryo maturation medium for 21 days in order to have somatic embryos for synthetic seed production.

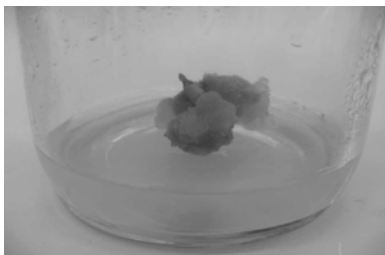


Figure 1 45-day Yellowish-nodular-friable embryogenic callus of *C. annuum* var. Ace.

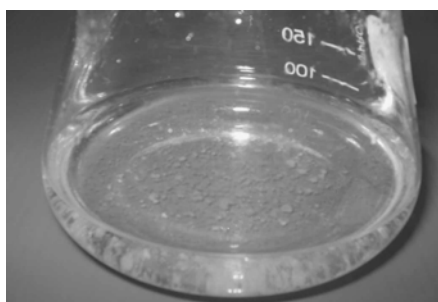


Figure 2 Homogeneous cell suspension transferred from callus.



Figure 3 Single cells transformed into globular-shape, heart- shape and torpedo-shape.

Synthetic seed production from somatic embryos of sweet pepper

Encapsulating somatic embryo with sodium alginate and CaCl_2 in different concentration brought about synthetic seeds (Figure 4). Then, dehydration were pursued until the seeds lost 80% of their moisture contents. The result was; sodium alginate and CaCl_2 affected survival percentage, speed of germination and gel flexibility. Encapsulating seeds with sodium alginate 2, 3 and 4% w/v concentration would bring about stable-shape seeds, rather hard. After dehydration was pursued until seeds lost 80% of their moisture contents. Encapsulation with 3 and 4% w/v concentration of sodium alginate would

stabilize synthetic seeds' shape and the germination rate would still be high (Table 1).

The germination took only 3-5 days which could be because of thin and soft encapsulate gel, helping embryos to germinate easily (Table 2). When considering gel's resistance force to pressure force, it was found that the resistance force were 7 and 12 newton (Table 3). This showed the high rigidity of gel encapsulating seeds which affects germination rate to decrease and germination period to increase when using high concentration because it was hard for somatic embryos to germinate through the thick gel. This result was similar to the experiment of Fourre *et al.* (1997) which proved that 4% w/v

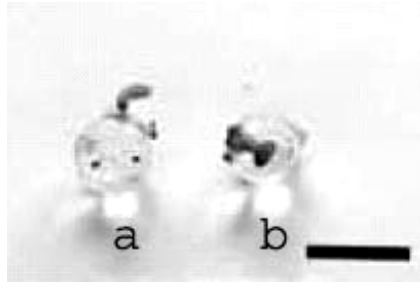


Figure 4 Synthetic seeds after planting in MS medium for 4 days.

- a. Encapsulate with sodium alginate 3% w/v and 75 mM calcium chloride.
- b. Encapsulate with sodium alginate 4% w/v and 75 mM calcium chloride.

Table 1 Effects of sodium alginate and calcium chloride concentration on synthetic seed germination percentage.

Sodium alginate (% w/v)	Germination percentage (%)			
	Calcium chloride (mM)			
	25	50	75	100
2	53 ^{ef 1/}	43 ^h	60 ^d	33 ⁱ
3	70 ^b	70 ^b	87 ^a	46 ^{gh}
4	63 ^{cd}	50 ^{fg}	67 ^{bc}	30 ^j
5	13 ^m	16 ^l	23 ^k	13 ^m
6	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ	0 ⁿ

^{1/}Numbers followed by the same English alphabets in the table represents no statistic significantly different ($P < 0.05$).

sodium alginate would inhibit somatic embryo germination while 1, 2 and 3% w/v sodium alginate brought about very high germination of somatic embryo. Nevertheless, 1% w/v concentration would gave weak encapsulation of synthetic seeds.

Another factor of sweet pepper synthetic seed germination was the CaCl_2 concentration. It was

found to affect speed of encapsulation reaction 25 and 50 mM concentration took 20-30 minutes while 5 and 100 mM concentration took only 10-15 minutes. The speed of reaction also affected synthetic seed survival percentage. In other words, shorter time in encapsulation by magnetic stirrer would less destroyed somatic embryos.

Table 2 Effects of sodium alginate and calcium chloride concentration on speed of germination of synthetic seed.

Sodium alginate (% w/v)	Calcium chloride (mM)			
	25	50	75	100
2	5 ^{b 1/}	5 ^b	5 ^b	5 ^b
3	3 ^a	3 ^a	3 ^a	5 ^b
4	3 ^a	5 ^b	5 ^b	6 ^c
5	6 ^c	6 ^c	7 ^d	6 ^c
6	0	0	0	0

^{1/}Numbers followed by the same English alphabets in the table represents no statistic significantly different ($P < 0.05$).

Table 3 Effect of sodium alginate concentration on resistance force to pressure force after dehydration.

Sodium alginate (% w/v)	Resistance force (N)
2	2
3	7
4	12
5	18
6	24

Conclusion

Sweet pepper synthetic seed production was successfully developed in this experiment. The survival rate of dried synthetic seeds was as high as 87%. The high level of seed vigor had been shown by their speed of germination which was only 3 days after sowing. The seed viability after longterm storage (2 months) or transport in ambient temperature (25 ± 2 °C) was also the satisfactory result.

References

- Buyukalaca, S. and F. Mavituna. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 227-235.
- Fourre, J.L., P. Berger, L. Niquet and P. Andre. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 159-169.

Harini, I. and G.L. Sita. 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chili (*Capsicum annuum* L.). Plant Science 89: 107-112.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

การวิเคราะห์พันธุกรรมของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อย ศรีสะเกษ 1 โดยเทคนิค RAPD-PCR

Genetic Analysis of Native Silkworm, Nangnoi Si Sa Ket 1 Variety, by RAPD-PCR Technique

จารุวรรณ จันทรา^{1/} จิราพร ตยุดิวิฏกุล^{1/} อังสนา อัครพิศาล^{2/} ทิพนรณี เสนะวงศ์^{3/}
และ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ^{4/}
Jaruwat Chanttra^{1/}, Jiraporn Tayutivutikul^{1/}, Angsana Akarapisan^{2/}, Tipanee Senawong^{3/}
and Weerathep Pongprasert^{4/}

Abstract: Thai native silkworm (*Bombyx mori* L.), Nangnoi Si Sa Ket 1, one of the certified varieties from Department of Agriculture, has been extensively distributed to others research stations in Thailand for sericulture promotion at farm level. Due to rapid multiplication rate, the genetically alteration and contamination within the variety presumably occurred. Accordingly, genetic analysis of native silkworm, Nangnoi variety based on Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) Technique was carried out to determine variation of this variety collected from various sericulture stations including Chiang Mai, Mukdahan, Nong Khai, Roi Et, Sakon Nakhon, Si Sa Ket, Ubon Ratchathani, and Udon Thani. Three native silkworm varieties including Kiewsakon, Nanglai, and Nangluang and also one wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval) variety were selected and assigned as corresponding referenced band patterns. DNAs of those silkworms were extracted from haemolymph and 18 RAPD primers were applied to random amplification. RAPD products were spreaded

^{1/} ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{3/} สถาบันหม่อนไหมแห่งชาติเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{4/} ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก 65000

^{1/} Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{2/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{3/} The Queen Sirikit Institute of Sericulture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^{4/} Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

on agarose gel-electrophoresis and polyacrylamide gel-electrophoresis to generate polymorphisms of DNA band pattern. RAPD primers OPO-07 and OPD-11 produced specific bands at 430 and 100 bp that specified Nangnoi Ubon obtained from Roi Et from others. Meanwhile, RAPD primer, OPN-02, also produced 2 specific bands. First band, 985 bp in size, differentiated between Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai from others and second band, 434 bp in size, separated Nangnoi into 2 groups: Nangnoi Ubon and Nangnoi Si Sa Ket. The combined analysis of band pattern generated by all those 3 primers supported that Nangnoi Ubon and Nangnoi Si Sa Ket was genetically related and recently diverged from each other perhaps caused mainly by the screening process during mass rearing of Nangnoi Si Sa Ket 1 in various research stations.

Keywords: Genetic analysis, Thai native silkworm, Nangnoi Si Sa Ket 1, RAPD-PCR

บทคัดย่อ: ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 เป็นไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์หนึ่งที่ได้รับการรับรองพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร และมีการแพร่ขยายพันธุ์ไปยังสถานที่ทดลองหม่อนไหมอื่น ๆ ทั่วประเทศไทยอย่างรวดเร็ว เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงอย่างกว้างขวาง ทำให้มีปัญหาความไม่บริสุทธิ์ภายในสายพันธุ์เกิดขึ้น ดังนั้นจึงได้ดำเนินการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ขึ้น ด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) เพื่อศึกษาความแปรปรวนของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่กระจายอยู่ตามศูนย์วิจัยหรือสถานที่ทดลองหม่อนไหมต่าง ๆ ได้แก่ เชียงใหม่ มุกดาหาร หนองคาย ร้อยเอ็ด สกลนคร ศรีสะเกษ อุบลราชธานี และอุดรธานี โดยใช้ไหมพื้นเมือง 3 พันธุ์ คือ เขียวสกล นางลาย และนางเหลือง และไหมป่า 1 พันธุ์ คือ *Samia ricini* Boisduval เป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่ม ดีเอ็นเอจากหนอนไหมสามารถสกัดได้จากเลือด และจากการใช้ RAPD ไพรมเมอร์ จำนวน 18 ไพรมเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม แล้วตรวจสอบแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และโพลีอะคริลไมด์เจล ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย พบว่าไพรมเมอร์ OPO-07 และ OPD-11 มีแถบดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงขนาด 430 และ 100 คู่เบส ตามลำดับ สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างไหมพันธุ์นางน้อยอุบลที่ได้จากร้อยเอ็ดออกจากไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่มาจากแหล่งอื่น ๆ ได้ และไพรมเมอร์ OPN-02 พบแถบดีเอ็นเอเฉพาะ 2 แถบ มีขนาด 985 และ 434 คู่เบส โดยแถบแรกสามารถใช้จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษจากหนองคายออกจากไหมพันธุ์นางน้อยจากแหล่งอื่น ๆ ได้ และแถบดีเอ็นเอที่สองมีขนาดเล็กกว่าสามารถใช้จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มนางน้อยศรีสะเกษและกลุ่มนางน้อยอุบลได้ ผลการวิเคราะห์ dendrogram จากการรวมข้อมูลของทั้ง 3 ไพรมเมอร์ พบว่า ไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับไหมนางน้อยที่ได้จากอุบลราชธานีมาก และมีแนวโน้มของการแยกตัวได้ไม่นาน ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการคัดเลือกในระหว่างการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ของนางน้อยศรีสะเกษ 1 ของศูนย์หรือสถานีวิจัยหม่อนไหมในสถานที่ต่าง ๆ

คำสำคัญ: การวิเคราะห์พันธุกรรม ไหมไทยพื้นเมือง พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 RAPD-PCR

คำนำ

ไหม (*Bombyx mori* Linnaeus) เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ในช่วงเวลาที่ผ่านมา รัฐบาลได้ให้ความสำคัญโดยส่งเสริมการเพาะเลี้ยง

สนับสนุนการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ไหมเพื่อให้ได้เส้นไหมที่มีคุณภาพดีขึ้นมาโดยตลอด ปัจจุบันพันธุ์ไหมที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีทั้งไหมพื้นเมือง ไหมพันธุ์ไทยลูกผสม และไหมพันธุ์ลูกผสมต่างประเทศ (สมโพธิ, 2539) ไหมไทยพื้นเมืองพันธุ์หลักที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงกัน

อย่างแพร่หลาย คือ พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ซึ่งได้รับการรับรองพันธุ์โดยกรมวิชาการเกษตร ปรับปรุงพันธุ์ครั้งแรกที่ศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ และได้แพร่ขยายไปยังสถานี่หม่อนไหมอื่น ๆ ทั่วประเทศไทยอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงอย่างกว้างขวาง จนทำให้ไม่สามารถผลิตไข่เพื่อการแจกจ่ายไปยังเกษตรกรผู้เลี้ยงได้อย่างพอเพียง สถานี่หม่อนไหมแห่งอื่น ๆ รวมทั้งเกษตรกรจึงผสมพันธุ์ใหม่ขึ้นเอง ทำให้เกิดปัญหาในเรื่องของควมบริสุทธิ์ภายในสายพันธุ์ขึ้น เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ใหม่ดังกล่าวเป็นอย่างมาก และยากลำบากต่อการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ซึ่งจำเป็นต้องใช้สายพันธุ์แท้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อกำหนดสายเลือดได้อย่างถูกต้องและชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีของสายพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 และนางน้อยอุบล ซึ่งการจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาหรือสรีรวิทยา ของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่กระจายตามแหล่งเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กระทำได้ยาก จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันมีวิธีที่สามารถช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและมีความแม่นยำมาก คือ วิธีการทางชีวโมเลกุล (กฤษณะ, 2545) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การตรวจสอบความแตกต่างของขนาดหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมาย (สุรินทร์, 2545) โดยการวิเคราะห์พันธุกรรมโดยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) และเป็นวิธีที่สามารถใช้จำแนกพันธุ์ประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตภายในกลุ่มประชากรเดียวกันได้อย่างมีประสิทธิภาพสามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ต้นทุนต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ (Hoy, 2003; Hadrys *et al.*, 1992) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค RAPD มาใช้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 โดยการสร้างแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific band) ของไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์มากได้ โดยข้อมูลที่ได้รับ

นอกจากช่วยในการจัดจำแนกสายพันธุ์แล้วยังเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการสร้าง probes หรือ primers หรือโมเลกุลเครื่องหมายอื่น ๆ เพื่อใช้ตรวจสอบและรับรองพันธุ์ต่อไปในอนาคต (Nagaraja and Nagaraju, 1995; Promboon *et al.*, 1995)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ทำการรวบรวมหนอนไหมพื้นเมืองพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี สถานี่ทดลองหม่อนไหมหนองคาย สถานี่ทดลองหม่อนไหมสกลนครและพันธุ์นางน้อยอุบล จากสถานี่ทดลองหม่อนไหมเชียงใหม่ สถานี่ทดลองหม่อนไหมมุกดาหาร ศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ และสถานี่ทดลองหม่อนไหมร้อยเอ็ด ส่วนพันธุ์นางเหลืองจากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ พันธุ์เขียวสกลและพันธุ์นางลายจากสถานี่ทดลองหม่อนไหมเชียงใหม่ และไหมป่า (*Samia ricini* Boisduval) จากศูนย์บริหารศัตรูพืชจังหวัดเชียงใหม่

2. ทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจาก haemolymph ของหนอนไหม โดยตัดขาเทียมด้วยกรรไกรสะอาด รองรับ haemolymph ที่ไหลออกมาลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เต็ม 2 เท่า ของ ultrapure water นำไปปั่นจนสังเกตเห็นกลุ่มของเส้นใยในสารละลาย ใช้ pipette tip เกี่ยวเอากลุ่มเส้นใยออกมาและย้ายใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ซึ่งมี TE buffer pH 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่านำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) และประทีป และคณะ (2545) โดยนำหลอดจากข้อ 2 เต็ม Proteinase-K 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-6 ชั่วโมง เขย่าหลอดอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา เติมน้ำ phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา (inversion) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสขึ้นบน

(supernatant) ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้น ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24 :1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมสารให้เข้ากันโดย คว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 5 M NaCl ในปริมาตร 1 ต่อ 10 เท่าของปริมาตร และ absolute ethanol ที่แช่เย็น 1 เท่าของปริมาตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เท สารละลายออก และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายออก นำไป อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงละลายด้วย TE buffer pH 8.0 เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอะกาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และวัดปริมาณด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาความเข้มข้นและปรับให้ได้ปริมาณที่ พอเหมาะกับการทำ PCR ต่อไป

4. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD-PCR ด้วย arbitrary primers ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology, Alamada US จำนวน 18 ชนิด โดยปฏิกิริยา PCR ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อแล้ว 2.0 ไมโครลิตร, Q solution 2.0 ไมโครลิตร, dNTPs (1mM) 2.0 ไมโครลิตร, 10X QIAGEN PCR 1.0 ไมโครลิตร, RAPD primer (0.4mM) 0.8 ไมโครลิตร, 0.5 ยูนิตของ Taq DNA polymerase 1.2 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 1.0 ไมโครลิตร นำหลอด PCR ใส่ใน เครื่อง PCR (AB Applied Biosystems รุ่น GeneAmp PCR system 2400) โดยเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ประกอบด้วย predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที 30 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที primer annealing ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 45 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 30 วินาที จำนวน 45 รอบ และ primer extension ที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ขั้นตอนสุดท้าย ขึ้นดี

เอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยอาร์เอพีดีตรวจสอบได้โดยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่องดูเจลภายใต้แสง อัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง UV Transilluminator ถ่ายภาพ ด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Gel Documentation บริษัท Syngene) หรือ ตรวจสอบผลผลิตของ RAPD โดยใช้วิธี อิเล็กโตรโฟรีซิสในอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเครื่อง Mini-Protein 3 Electrophoresis ย้อมใน เอทิลเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5 นาที ส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV Transilluminator ถ่ายภาพด้วยเครื่อง ถ่ายภาพเจล (Gel documentation) พร้อมบันทึกเพื่อนำ แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ต่อไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมระหว่างหน่อใหม่พันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 นางเหลือง นางลาย เขียวสกล และไหมป่า ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) ของ Dice และสร้าง dendrogram โดยใช้โปรแกรม Gene Tools และ Gene Directory ของ บริษัท Syngene

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของไหมพื้นเมืองพันธุ์นาง น้อยศรีสะเกษ 1 และนางน้อยอุบล จากแหล่งต่าง ๆ ที่ สร้างด้วย arbitrary primer ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวนทั้งหมด 18 ชนิด โดยเทคนิค RAPD-PCR นั้น พบว่า มีไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ K-09, OPA-02, OPA-15, OPL-11, OPO-07, OPR-06, OPR-11, OPS-03, และ OPW-01 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความ แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งเพาะเลี้ยงต่าง ๆ ได้ โดยจำแนกไหมพันธุ์นางน้อยอุบลจากสถานีทดลอง หม่อนไหมร้อยเอ็ดออกจากไหมที่เลี้ยงในสถานีอื่น ๆ แต่ ลายพิมพ์ที่ให้ความแตกต่างมากที่สุดและสามารถพบ แถบดีเอ็นเอจำเพาะหลายที่สามารถใช้ประโยชน์ใน การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไปในอนาคตได้คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับจากไพรเมอร์ OPO-07 (ภาพที่ 1)

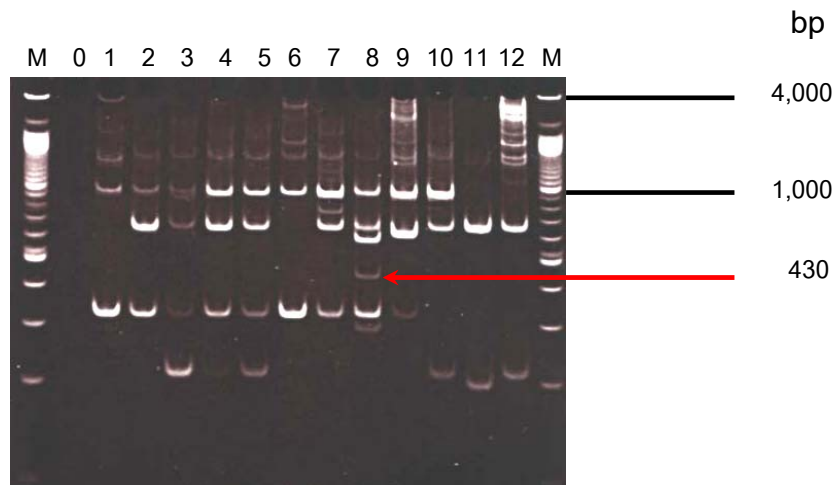


Figure 1 Genome fingerprinting of silkworms, Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon group, and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm based on primer OPO-07 of RAPD technique and specific band at 430 bp for identifying Nangnoi Si Sa Ket : M = 100 bp DNA ladder, Promega, 0 = Negative control, 1 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 5 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval), 11 = Nanglai, 12 = Kiewsakon.

OPD-11 (ภาพที่ 2) และ OPN-02 (ภาพที่ 3) โดยไพรเมอร์ OPO-07 และ OPD-11 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 430 และ 100 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยอุบลที่ได้จากสถานีทดลองหม่อนไหมร้อยเอ็ดออกจากไหมพันธุ์นางน้อยที่ได้มาจากแหล่งอื่นๆ ได้อย่างชัดเจน

ส่วน ไพรเมอร์ OPN-02 พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 2 ขนาด คือ 985 และ 434 คู่เบส จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 985 คู่เบส สามารถใช้จำแนกระหว่างไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จากสถานีทดลองหม่อนไหมหนองคายออกจากไหมพันธุ์นางน้อยที่ได้มาจากแหล่งอื่นๆ ได้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 434 คู่เบส สามารถ

จำแนกไหมพันธุ์นางน้อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ และกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยอุบลได้อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอชิ้นเล็กนี้สามารถพบได้ในไหมพันธุ์เหี่ยวสกล และนางลายด้วยเช่นกัน ดังนั้นการนำแถบดีเอ็นเอนี้มาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องมีการจัดการอย่างเหมาะสม และควรมีการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติมจนมีข้อมูลที่ชัดเจนเพียงพอ

เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากไพรเมอร์แต่ละชนิดจากทั้ง 3 ไพรเมอร์ข้างต้นมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสายพันธุ์ไหมจากแหล่งต่างๆ มีความสัมพันธ์ในระดับต่างๆ แตกต่างไปตามชนิดของไพรเมอร์ เนื่องจากความหลากหลายของ

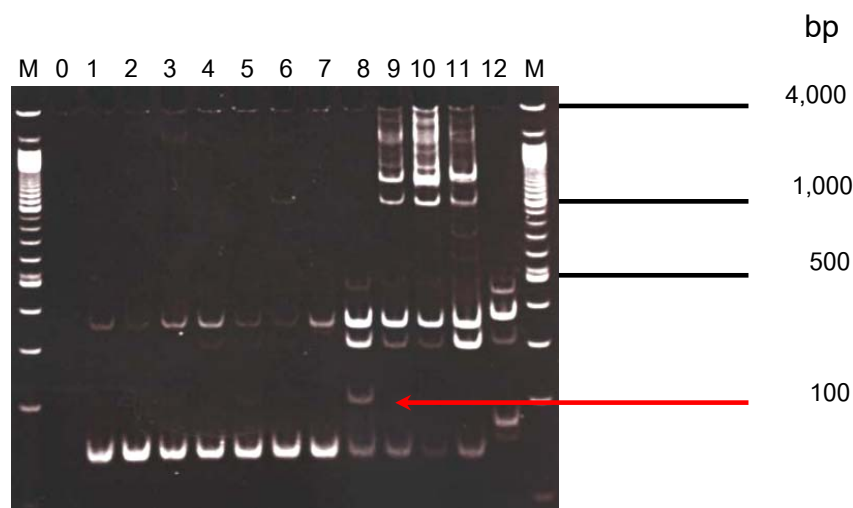


Figure 2 Genome fingerprinting of silkworms, Nangnoi Sri Sa Kate group, Nangnoi Ubon group, and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm based on primer OPD-11 of RAPD technique and specific band at 100 bp for identifying Nangnoi Si Sa Ket : M = 100 bp DNA ladder, Promega, 0 = Negative control, 1 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 5 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = Kiewsakon, 11 = Nanglai, 12 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

แถบดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละชนิดนั้นมีจำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ไม่ชัดเจนแม้ว่าผลที่ได้รับสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ใหม่ที่เป็นกลุ่มหลักได้ก็ตาม ดังนั้นเพื่อสร้างความหลากหลายของข้อมูลให้มากขึ้น จึงได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ในลักษณะของการรวมข้อมูลจากลายพิมพ์ทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกัน (Muyan *et al.*, 2001) พบว่าสามารถให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) อยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.0-0.78 (ตารางที่ 1) โดยไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ ที่มาจากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี มีค่า genetic distance เป็น

0 และไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษจากทั้งสองแหล่งนี้ ยังมีความใกล้ชิดกับไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จากสถานที่ทดลองหม่อนไหมหนองคายและสกลนคร มาก โดยมีค่า genetic distance เท่ากับ 0.14 และ 0.16 ตามลำดับ และไหมในกลุ่มนางน้อยที่มีความแตกต่างมากที่สุดคือไหมนางน้อยศรีสะเกษจากหนองคายและนางน้อยอุบลจากศรีสะเกษ โดยมีค่า genetic distance เท่ากับ 0.39

เมื่อนำข้อมูลของ genetic distance มาประมวลและสร้างความสัมพันธ์ในรูป dendrogram (ภาพที่ 4) พบว่าสามารถจำแนกไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มแรก ประกอบด้วยไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษที่ได้จาก 4 แหล่ง คือ ศูนย์วิจัยหม่อน

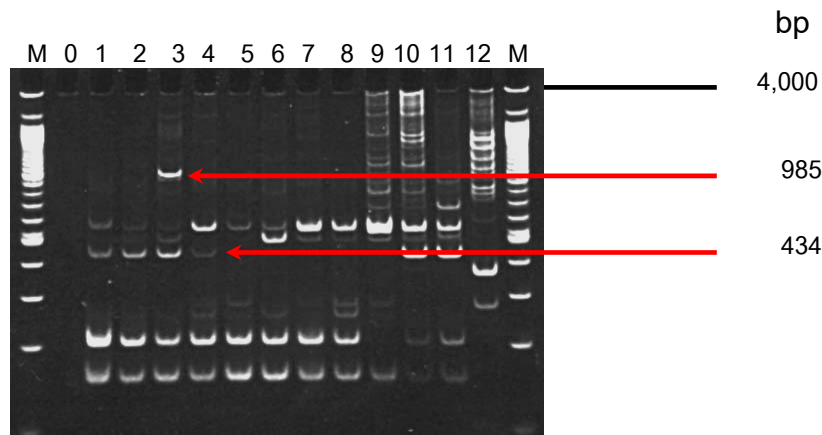


Figure 3 Genome fingerprinting of silkworms, Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon group, and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm based on primer OPN-02 of RAPD technique and specific band at 985 and 434 bps for identifying Nangnoi Si Sa Ket : M = 100 bp DNA ladder, Promega, 0 = Negative control, 1 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 5 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = Kiewsakon, 11 = Nanglai, 12 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

ไหมศรีสะเกษ ศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี สถานีทดลองหม่อนไหมหนองคาย และสถานีทดลองหม่อนไหมสกลนคร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ไหมพันธุ์นางน้อยอุบลที่ได้จาก สถานีทดลองหม่อนไหมเชียงใหม่ สถานีทดลองหม่อนไหมมุกดาหาร ศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ และสถานีทดลองหม่อนไหมร้อยเอ็ด และสามารถแยกออกจากไหมพันธุ์เปรียบเทียบ ประกอบด้วย ไหมพันธุ์นางเหลือง นางลาย เขียวสกล และไหมป่า ออกจากกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยได้อย่างชัดเจน

ในกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ นั้นพบว่า พันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ 1 ที่ได้จากศรีสะเกษ ซึ่งจัดเป็นพันธุ์ดั้งเดิม มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่มีแหล่งจากอุดรธานีมากที่สุด ตามด้วยสายพันธุ์ที่มีแหล่งจากหนองคาย และสกลนครตามลำดับ ส่วนกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยอุบลจากแหล่งเชียงใหม่ มีความใกล้ชิด

กับพันธุ์ที่มีแหล่งจากมุกดาหารมากที่สุดตามด้วยพันธุ์ที่มีแหล่งจากศรีสะเกษตามลำดับ โดยพันธุ์ไหมทั้งสองกลุ่มข้างต้นมีสายพันธุ์นางน้อยอุบลจากร้อยเอ็ดเป็นตัวเชื่อมต่อความสัมพันธ์ ความแปรปรวนหรือความหลากหลายที่เกิดขึ้นในสายพันธุ์ร่วมกับการมีส่วนร่วมของความใกล้ชิดกันอย่างมากระหว่างทั้งสองกลุ่มสายพันธุ์บ่งบอกถึงการมีแหล่งสายพันธุ์ต้นกำเนิดเดียวกัน และการแบ่งแยกของสายพันธุ์ยังอยู่ในระยะเริ่มต้นเท่านั้นทั้งนี้การแบ่งแยกที่ปรากฏพบนี้อาจมีสาเหตุหลักจากกระบวนการคัดเลือกในขณะที่มีการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนเพื่อแจกจ่ายและเผยแพร่พันธุ์ไหมแก่เกษตรกรซึ่งสายพันธุ์ที่แปรปรวนเหล่านั้นได้รับการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องในแต่ละแหล่งจนทำให้เกิดการขับเคลื่อนของกระบวนการแยกตัวของสายพันธุ์ขึ้นในที่สุด

Table 1 Genetic distance among Thai silkworm: Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm calculated from combined data of RAPD genome fingerprint generated from primers: OPO-07, OPD-11, and OPN-02.

Varieties	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.00											
2	0.00	0.00										
3	0.14	0.14	0.00									
4	0.16	0.16	0.18	0.00								
5	0.29	0.29	0.30	0.33	0.00							
6	0.22	0.22	0.24	0.26	0.30	0.00						
7	0.30	0.30	0.39	0.24	0.26	0.30	0.00					
8	0.36	0.36	0.29	0.23	0.33	0.36	0.26	0.00				
9	0.60	0.60	0.64	0.54	0.50	0.52	0.41	0.44	0.00			
10	0.45	0.45	0.52	0.39	0.62	0.64	0.50	0.45	0.31	0.00		
11	0.33	0.33	0.42	0.36	0.50	0.52	0.48	0.43	0.50	0.28	0.00	
12	0.67	0.67	0.72	0.68	0.65	0.78	0.60	0.60	0.76	0.73	0.62	0.00

Remarks: 1 = Nangnoi Si Sa Ket from Si Sa Ket, 2 = Nangnoi Si Sa Ket from Udon Thani, 3 = Nangnoi Si Sa Ket from Nong Khai, 4 = Nangnoi Si Sa Ket from Sakon Nakhon, 5 = Nangnoi Ubon from Chiang Mai, 6 = Nangnoi Ubon from Mukdahan, 7 = Nangnoi Ubon from Si Sa Ket, 8 = Nangnoi Ubon from Roi Et, 9 = Nangluang, 10 = Kiewsakon, 11 = Nanglai, 12 = wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

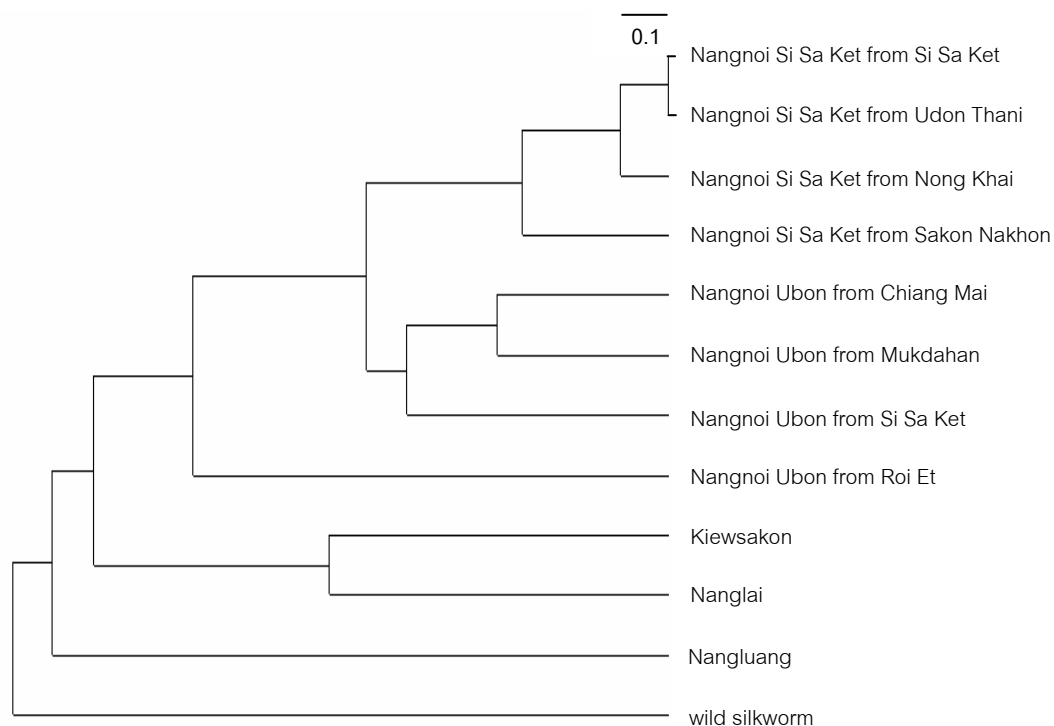


Figure 4 Dendrogram showed the relationship among Nangnoi Si Sa Ket group, Nangnoi Ubon and out group composed of Nangluang, Nanglai, Kiewsakon, and wild silkworm (*Samia ricini* Boisduval).

สรุปผล

การวิเคราะห์พันธุกรรมของไหมพันธุ์นางน้อย ศรีสะเกษ 1 ครั้งนี้ ทำให้เกิดความชัดเจนของสายพันธุ์ไหมนางน้อยศรีสะเกษที่เพาะเลี้ยงอยู่ตามสถานที่ทดลองหรือศูนย์วิจัยหม่อนไหมของจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทย นั้นได้เกิดกระบวนการคัดเลือกในระหว่างการเพาะเลี้ยงขึ้นจนทำให้สามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยศรีสะเกษ และกลุ่มไหมพันธุ์นางน้อยอุบล และสามารถอธิบายถึงความเกี่ยวพันทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มและภายในกลุ่มได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้รับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสายพันธุ์ไหมนางน้อยให้มีความเหมาะสมกับสภาพพื้นที่เพาะเลี้ยงและการตรวจสอบสายพันธุ์หรือรับรองสายพันธุ์ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และสถาบันหม่อนไหมแห่งชาติ เฉลิมพระเกียรติฯ ที่สนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กฤษณะ เรืองฤทธิ์. 2545. การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียเพื่อการจำแนกพันธุ์ไหมไทยพื้นเมือง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 59 หน้า.

ประทีป มีศิลป์, จิราพร ตยุดิวิกุล, ทิพรณี เสนะวงศ์, พงศธร ธรรมณอม, เพท่าย พงษ์เพียจันทร์, ศานิต รัตนภูมิ และ สุรชาติพิทย์ ห้องทองแดง. 2545. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไหมชนิดฟักออกตลอดปีในประเทศไทย. หน้า 103-

116. ใน: เอกสารประกอบการประชุมวิชาการหม่อนไหมประจำปี 2545. สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สมโพธิ อัครพันธุ์. 2539. การพัฒนาหม่อนไหมในประเทศไทย. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. 181 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

Hadrys, H., M. Balick and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1(1): 55-63.

Hoy, M. A. 2003. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Application*. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 544 pp.

Muyan, G., Z. Zhenghong and C. Yuanlin. 2001. A study on molecular phylogenetics and molecular marker of species of silkworms. *Hereditas* 23(1): 25-28.

Nagaraja, G. M. and J. Nagaraju. 1995. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori*, using random arbitrary primers. *Electrophoresis* 16(9): 1633-1638.

Promboon, A., T. Shimada, H. Fujiwara and M. Kobayashi. 1995. Linkage map of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetical Research* 66(1): 1-7.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการควบคุมโรค ถอดผักตบขำของข้าวในระยะต้นกล้า

Efficacies of Plant Essential Oils in Controlling Bakanae Disease of Rice Seedling

สายชล โนชัย^{1/} และ สมบัติ ศรีชูวงศ์^{1/}

Saichon Nochai^{1/} and Sombat Srichuwong^{1/}

Abstract: Blotter method was used to detect *Fusarium moniliforme*, the causal agent of bakanae disease on rice seeds cv. Khao Dawk Mali 105 (KDML 105). Only 13.50% of seeds were contaminated with the fungus. Another trial was dealt with 5 essential oils extracted from 5 different plants and they were incorporated with PDA and tested for their ability to cease the growth of *F. moniliforme*. It was pointed out that essential oils from clove, cinnamon and geranium at the rates of 400, 500 and 1,400 ppm, respectively, gave 100% inhibitive results. Among them, clove oil had the abilities to reduce the incidence of the disease and increase seed germination, seedling emergence, shoot length, root length, fresh weight and dried weight.

Keywords: Rice, bakanae disease, *Fusarium moniliforme*, essential oils, control

บทคัดย่อ: จากการตรวจหาเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคถอดผักตบขำ จากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะบนกระดาษซับ พบเชื้อรา *F. moniliforme* ร้อยละ 13.50 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย พบว่าน้ำมันจากกานพลู อบเชยและเจอราเนียมที่มีความเข้มข้น 400 500 และ 1,400 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้ 100% และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 3 ชนิดไปแช่เมล็ดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อความงอกของเมล็ด การควบคุมโรคและการเจริญเติบโตของต้นกล้า พบว่ามีเพียงน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูเท่านั้นที่ให้ผลดีที่สุด โดยสามารถลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ด และช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ความงอกในแปลง ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้า

คำสำคัญ: ข้าว โรคถอดผักตบขำ *Fusarium moniliforme* น้ำมันหอมระเหย การป้องกันกำจัด

^{1/}ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200.

^{1/}Department of Plant Phthology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

โรคยอดผักดาบของข้าว เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* เป็นโรคที่พบระบาดทั่วโลกที่มีการปลูกข้าว และทำให้ปริมาณของผลผลิตข้าวลดลงมาก (Ou, 1985) เชื้อราสาเหตุโรคสามารถแพร่ระบาดได้หลายทาง สำหรับการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ เชื้อราสาเหตุติดมากับเมล็ด ส่งผลกระทบตั้งแต่ในด้านความงอกของเมล็ดที่ทำให้ความงอกของเมล็ดลดลง การติดเชื้อหรือการเข้าทำลายเมล็ดนั้นทำให้เมล็ดเน่าตายก่อนงอก ตลอดจนต้นกล้าปกติที่มีปริมาณน้อยลงเนื่องจากพบลักษณะอาการของระยะต้นกล้า ต้นกล้าจะเกิดอาการยืดยาวผิดปกติ (Booth, 1971) ต้นข้าวเขียวช้ำ มักยางปล้องและมีรากเกิดขึ้นที่ข้อต่อของลำต้น รากเน่า และถ้าเป็นโรครุนแรงต้นกล้าข้าวจะตาย ถ้าเกิดโรคไม่รุนแรง อาการจะแสดงหลังจากย้ายกล้าไปปักดำแล้ว โดยต้นที่เป็นโรคจะสูงกว่าต้นข้าวปกติ ใบมีสีเขียวช้ำ บางครั้งพบกลุ่มของเส้นใยสีขาวหรือสีชมพูตรงบริเวณข้อที่ยางปล้อง และต้นข้าวจะตายหลังจากนั้น

การป้องกันกำจัดโรคส่วนใหญ่ใช้สารเคมีคลุกเมล็ดในการควบคุมโรคในระยะกล้าและฉีดพ่นในแปลงปลูก แต่เนื่องจากสารเคมีหลายชนิดมีพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อคนและสัตว์เลี้ยงอย่างรุนแรง ประกอบกับพบว่าเชื้อราสาเหตุอาจสามารถเกิดความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อราได้ (Ogawa, 1988) จึงได้มีการค้นหาวิธีการในการป้องกันกำจัดโดยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีให้มากที่สุด การใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช สิริวิภา (2536; อ้างโดย สุคนธ์ทิพย์, 2543) ได้ใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืช 18 ชนิด นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของพริกและ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของมะม่วง พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกความเข้มข้นจากตะไคร้ ตะไคร้หอม ผักแขยง กะเพรา กานพลู สะระแหน่ และจันทร์เทศ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ได้ 100% ส่วนน้ำมันหอมระเหยทุกความเข้มข้นจากตะไคร้ ตะไคร้หอม ผักแขยง กะเพรา กานพลู สะระแหน่ และไพลสามารถ

ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100% เช่นกัน

Hammer *et al.* (1999) และ Dorman and Deans (2000) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู อบเชย สะระแหน่ ออริกาโน กระเทียม ตะไคร้หอม และไทม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากไทม์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* และ *Penicillium chrysogenum* ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 100-1,000 ppm

อนงค์นาถ (2547) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 11 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของกะหล่ำปลี พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ตะไคร้ต้น และเปปเปอร์มินต์ที่ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ 100 % และยังพบว่าน้ำมันตะไคร้หอมและตะไคร้ต้นสามารถช่วยลดการติดเชื้อของเมล็ด เพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ความงอกไหล่พื้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลีได้ดี

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการนำเอาน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด มาใช้ควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตลอดจนผลกระทบต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า เพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และเชื้อราอื่นๆ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น (Blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) นำมาเพาะเมล็ดจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะนี้ไป

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง Stereo microscope ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้อง Compound microscope

2. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และผลต่อความงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโตของต้นกล้า

2.1 การศึกษาผลต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย

นำน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดคือ กานพลู (clove) และอบเชย (cinnamon) มาผสมกับอาหาร PDA โดยใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 10 20 30 40 และ 50 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิเมตร ซึ่งจะให้ความเข้มข้น 100 200 300 400 และ 500 ppm ส่วนน้ำมันหอมระเหย อีก 3 ชนิดคือ เจอร์ราเนียม (geranium) ลาเวนเดอร์ (lavender) มาร์จอราม (marjoram) ใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาตร 50 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิเมตร จะให้ความเข้มข้น 500 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 3,500 4,000 4,500 และ 5,000 ppm เทส่วนผสมลงในจานอาหาร จานละ 20 มิลลิเมตร โดยทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ แล้วย้ายชิ้นส่วนของเชื้อรา *F. moniliforme* ลงตรงกลางจานอาหาร บันทึกผลขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 10 วันของทุกซ้ำ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สูตร (เกษม, 2532)

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \left(\frac{A-B}{A} \right) \times 100$$

A = เส้นผ่าศูนย์กลางชุดควบคุม

B = เส้นผ่าศูนย์กลางชุดทดสอบ

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำ นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

2.2 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการงอก การเจริญเติบโต และการเกิดโรคในระยะต้นกล้าข้าว

นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดลองที่ 2.1 ไปทำเป็นสารละลายโดยใช้ความเข้มข้นจากการทดลองที่ 2.1 นำ สารละลายน้ำมันหอมระเหย ปริมาตร 40 มิลลิตร ผสมกับสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *F. moniliforme* เข้มข้น 2×10^7 สปอร์/มิลลิตร ในปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดข้าวไปปลูกเชื้อโดยการแช่ในส่วนผสมดังกล่าวนาน 2 ชั่วโมง แล้วผึ่งเมล็ดให้แห้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 นำไปเพาะบนกระดาษขึ้น (เหมือนการทดลองที่ 1) จากนั้นทำการตรวจหาการติดเชื้อบนเมล็ดและผลต่อความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และในส่วนที่ 2 ทำการตรวจหาความงอกโผล่พื้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ 28 วัน

กรรมวิธีในการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 1 (ผลจากการทดลองที่ 2.1)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 2 (ผลจากการทดลองที่ 2.1)

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด ลำดับที่ 3 (ผลจากการทดลองที่ 2.1)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น ผลปรากฏว่า

พบเชื้อราทั้งหมด 11 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* 13.50 % และพบเชื้อราอื่น ๆ ดังนี้ *Aspergillus flavus* (4.00 %) *Bipolaris oryzae* (2.25 %), *Penicillium* sp. (2.25 %), *Xylaria* sp. (1.25 %), *Trichoderma* sp. (1.00 %), *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata*, *Trichoconis padwickii* (0.50 %), *Aspergillus glaucus* และ unknown fungus (0.25 %) (ตารางที่ 1) โดยเชื้อราที่พบนี้ *F. moniliforme* และ *B. oryzae* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคยอดผักตบและโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว ตามลำดับ และสามารถติดมากับเมล็ดข้าวได้เสมอ (สมคิด, 2532; Ou, 1985)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และผลต่อความงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้า

2.1 การศึกษาผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *F. moniliforme* บนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ น้ำมันกานพลู อบเชย มาจอราเม ลาเวนเดอร์ และเจอรานิยม ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยทดสอบเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดในอัตราความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ ที่ความเข้มข้น 500 – 5,000 ppm พบว่า น้ำมันเจอรานิยมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้ดีที่สุดคือที่ความเข้มข้น 1,500 ppm เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตพบว่าให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ตั้งแต่ 67 – 100 % (ตารางที่ 1) รองลงมาคือ มาร์จอราเม (58 - 93%) (ตารางที่ 2) และลาเวนเดอร์ (49 - 86%) (ตารางที่ 2) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 100 – 500 ppm พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100% ที่ความเข้มข้น 400 ppm (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1) ส่วนอบเชยนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100% ที่ความเข้มข้น 500 ppm (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1) และจากการที่น้ำมันเจอรานิยมสามารถให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการ

เจริญได้ถึง 100 % ที่ความเข้มข้นเพียง 1,500 ppm จึงหาความเข้มข้นที่อยู่ระหว่าง 1,000 – 1,500 ppm โดยเริ่มต้นที่ 1,100 – 1,500 ppm พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 100 % ได้ในความเข้มข้นที่ 1,400 ppm (ตารางที่ 3)

2.2 การศึกษาผลต่อการงอก การเจริญเติบโต และการเกิดโรคในระยะต้นกล้า การเพาะบนกระดาษขึ้น

ผลจากการเพาะบนกระดาษขึ้นของกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* และ แชนเกล็ดในน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่าน้ำมันมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกให้แก่เมล็ดข้าวได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ที่แชนเกล็ดด้วยน้ำมันหอมระเหยด้วยกัน คือน้ำมันกานพลู โดยให้ความงอกของเมล็ดสูงถึง 99 % แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อและกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อแล้วแชนเกล็ดด้วยกรรมวิธีน้ำผสมกับแอลกอฮอล์ รองลงมาคือ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแชนเกล็ดด้วยน้ำมันอบเชย ซึ่งมีความงอกของเมล็ด 68 % แต่น้ำมันเจอรานิยมนั้นทำให้เมล็ดข้าวไม่สามารถงอกได้เลย (ตารางที่ 4) ส่วนผลน้ำมันหอมระเหยต่อการติดเชื้อของเมล็ด พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแชนเกล็ดด้วยน้ำมันอบเชยและน้ำมันเจอรานิยมมีประสิทธิภาพช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด โดยไม่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดเลย ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ด รองลงมาคือ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแชนเกล็ดด้วยน้ำมันกานพลู ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ด 13.50% (ตารางที่ 4) สำหรับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อเปอร์เซ็นต์ของต้นกล้าผิดปกติ พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแชนเกล็ดด้วยน้ำมันกานพลูและอบเชยมีประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อและกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อแล้วแชนเกล็ดด้วยกรรมวิธีน้ำผสมแอลกอฮอล์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ 2 4 1 และ 2 % ตามลำดับ แต่แตกต่างจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อที่เมล็ด โดยพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดสูงที่สุดคือ 95.25 % และต้นกล้าผิดปกติสูงถึง 50 % (ตารางที่ 4)

Table 1 Percentage of fungi associated with seed of rice cv. KDML 105

Fungi	Percentage ^{1/}
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.25
<i>A. niger</i>	0.50
<i>A. flavus</i>	4.00
<i>Bipolaris oryzae</i>	2.25
<i>Curvularia lunata</i>	0.50
<i>Fusarium moniliforme</i>	13.50
<i>Penicillium</i> sp.	2.25
<i>Trichoconis padwickii</i>	0.50
<i>Trichoderma</i> sp.	1.00
<i>Xylaria</i> sp.	1.25
Unknown fungus	0.25

^{1/} Each value is a mean of 4 replicates of 400 seeds.

Table 2 Effectiveness of 3 essential oils at different concentrations mixed with PDA on growth inhibition of *Fusarium moniliforme* after 10 days of incubation.

Treatment	Growth inhibition (%) ^{1/} at different concentrations (ppm)									
	500	1,000	1,500	2,000	2,500	3,000	3,500	4,000	4,500	5,000
PDA + Geranium oil	67.11	90.22	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
PDA + Lavender oil	49.78	54.56	57.33	60.67	64.67	64.67	71.89	75.44	81.11	86.11
PDA + Marjoram oil	57.89	60.78	67.44	73.44	74.33	80.78	86.11	89.00	89.00	93.33
PDA (Control)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LSD _{0.05}	6.71	CV _(a) (%)		15.21	CV _(b) (%)		13.39			

^{1/} Results showed the average of 5 replications.

การเพาะในดินอบฆ่าเชื้อ

ผลจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลู มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกในแปลงให้แก่ต้นกล้าข้าวได้ดีที่สุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำผสมแอลกอฮอล์ รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย โดยมีความงอกในแปลง 97.99 และ 81 % ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวพบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันอบเชยให้ความงอกที่ต่ำกว่าชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว

(ตารางที่ 5) ส่วนผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดต่อเปอร์เซ็นต์ของต้นกล้าผิดปกติ พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลู มีประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ 5 และ 8 % ตามลำดับ (ตารางที่ 5) สำหรับการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดต่อความยาวลำต้นของต้นกล้าข้าว จากการการเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพช่วย

Table 3 Percent inhibition of *Fusarium moniliforme* grown on PDA mixed with 3 essential oils at 5 different concentrations.

Treatment	Concentration (ppm)	Percentage of inhibition ^{1/} (%)
PDA + Clove oil	100	19.22 g ^{2/}
	200	23.44 g
	300	90.22 b
	400	100.00 a
	500	100.00 a
PDA + Cinnamon oil	100	18.78 g
	200	30.33 f
	300	48.89 e
	400	62.11 d
	500	100.00 a
PDA + Geranium oil	1,100	79.78 c
	1,200	80.11 c
	1,300	84.89 bc
	1,400	100.00 a
	1,500	100.00 a
PDA		0.00 h
LSD _{0.05}	= 6.57	CV (%) = 8.10

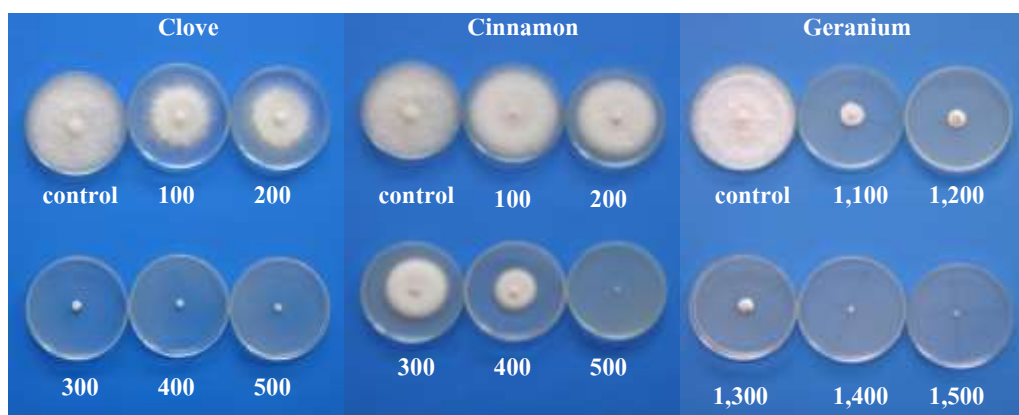
^{1/} Results showed the average of 5 replications.^{2/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.Figure 1 Growth inhibition of *Fusarium moniliforme* 10 days grown on PDA mixed with clove, cinnamon and geranium oils at 5 concentrations (ppm).

Table 4 Effect of 3 essential oils on seed germination, seed infection and abnormal seedling of rice seed inoculated with *Fusarium moniliforme* in moist petridishes.

Treatment	Seed germination ^{1/} (%)	Seed infection ^{1/} (%)	Abnormal seedling ^{2/} (%)
Control (uninoculated)	99.50 a ^{3/}	10.25 c	0.76 bc
Control (inoculated)	97.25 b	95.25 a	49.43 a
Inoculated + water + Alcohol	99.00 a	45.50 b	2.03 bc
Inoculated + clove oil	98.75 a	13.50 c	1.53 bc
Inoculated + cinnamon oil	67.50 c	0.00 d	4.04 b
Inoculated + geranium oil	0.00 d	0.00 d	0.00 c
LSD _{0.05}	1.29	7.95	3.62
CV (%)	0.97	19.52	25.30

^{1/} Each value is a mean of 4 replicates.

^{2/} Each value is a mean of 4 replicates of 80 seedlings.

^{3/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

เพิ่มความยาวลำต้นของต้นกล้าได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ (ตารางที่ 5) สำหรับการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าว จากการเปรียบเทียบผลทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความยาวรากของต้นกล้าได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ (ตารางที่ 5) ส่วนการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว โดยการวัดจากน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลูให้น้ำหนักสดของต้นกล้าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากทุกกรรมวิธี ยกเว้นชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อ (ตารางที่ 5)

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* และช่วยเพิ่มความแข็งแรงของต้นกล้าข้าวด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากในน้ำมันหอมระเหยมีสารประกอบที่สำคัญบางชนิดที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยสารเหล่านี้ อาจเป็น thymol, carvacol, cinnamic aldehyde และ allyl isothiocyanate เป็นต้น (Basilico and Basilico, 1999)

สรุป

จากการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *F. moniliforme* พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100 % ที่ความเข้มข้นเพียง 400 ppm รองลงมาคือ อบเชย 500 ppm และเจอรานิยม 1,400 ppm สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อความงอกของเมล็ด การติดเชื้อของเมล็ด และการเกิดโรคของต้นกล้าข้าวจากการเพาะบนกระดาษชื้น พบว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดช่วยเพิ่มความงอกให้แก่เมล็ดข้าว ลดการติดเชื้อของเมล็ด และลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย แต่ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกที่ต่ำกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ ไม่พบการติดเชื้อบนเมล็ดเลย ให้ต้นกล้าผิดปกติในอัตราที่ต่ำ ส่วนน้ำมันเจอรานิยมนั้นเมล็ดไม่สามารถงอกได้เลยทั้งหมด และไม่มี การติดเชื้อของเมล็ดอีกด้วย อาจเนื่องจากน้ำมัน

Table 5 Effect of 3 essential oils on emergence and seedling vigour of rice seed inoculated with *Fusarium moniliforme* in sterilized soil.

Treatment	Emergence ^{1/} (%)	Shoot length ^{1/} (cm)	Root length ^{1/} (cm)	Fresh weight ^{1/} (g)	Dry weight ^{1/} (g)
Control (uninoculated)	93.50 b ^{2/}	27.63 b	8.80 c	3.50 ab	0.55 b
Control (inoculated)	88.25 c	27.42 b	7.85 c	3.24 b	0.52 b
Inoculated + water + alcohol	98.75 a	28.27 ab	13.64 a	3.70 a	0.62 a
Inoculated + clove oil	97.00 a	29.43 a	11.89 b	3.87 a	0.66 a
Inoculated + cinnamon oil	80.75 d	29.49 a	8.82 c	3.58 ab	0.62 a
Inoculated + geranium oil	0.00 e	0.00 c	0.00 d	0.00 c	0.00 c
LSD _{0.05}	2.19	1.54	1.22	0.38	0.05
CV (%)	2.56	4.38	9.67	8.62	7.28

^{1/} Each value is a mean of 4 replicates.^{2/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

เจอราเนียมมีความเข้มข้นไม่เหมาะสมกับเมล็ด ส่วนผลจากการเพาะในดินอบฆ่าเชื้อ พบว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอก แปลง ต้นกล้าผิดปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง ร่องลงมาคือ น้ำมันอบเชย และน้ำมันเจอราเนียม ที่ให้ผลในด้านความงอกลดลงตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวโพดโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช 9(1): 28-33.

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ. 2543. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพร ในการควบคุมโรคใบจุดออกดอกบนใบของกะหล่ำปลี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 95 หน้า.

สมคิด ดิสภาพร. 2532. ขาวนาปราบโรคข้าว. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

อนงค์นาถ แต่เชื้อสาย. 2547. การถ่ายทอดโรคความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการป้องกันกำจัดของ *Alternaria brassicicola* ที่ติดมากับเมล็ดกะหล่ำปลี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 108 หน้า.

Basilico, M.Z. and J.C. Basilico. 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. Letters in Applied Microbiology 29(4): 238-241.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 58 pp.

Dorman, H.J.D. and S.G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88(2): 308-316.

Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86(6): 985-990.

- International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing; Annexes 1976. Seed Sciences and Technology 4: 3-49.
- Ogawa, K. 1988. Damage by "bakanae" disease and its chemical control. Japan Pesticide Information 52:13-15.
- Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed, Commonwealth Mycological Institute, Kew. 380 pp.
-

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการควบคุมโรค ถอดผักตบขำของข้าวในระยะต้นกล้า

Efficacies of Plant Essential Oils in Controlling Bakanae Disease of Rice Seedling

สายชล โนชัย^{1/} และ สมบัติ ศรีชูวงศ์^{1/}

Saichon Nochai^{1/} and Sombat Srichuwong^{1/}

Abstract: Blotter method was used to detect *Fusarium moniliforme*, the causal agent of bakanae disease on rice seeds cv. Khao Dawk Mali 105 (KDML 105). Only 13.50% of seeds were contaminated with the fungus. Another trial was dealt with 5 essential oils extracted from 5 different plants and they were incorporated with PDA and tested for their ability to cease the growth of *F. moniliforme*. It was pointed out that essential oils from clove, cinnamon and geranium at the rates of 400, 500 and 1,400 ppm, respectively, gave 100% inhibitive results. Among them, clove oil had the abilities to reduce the incidence of the disease and increase seed germination, seedling emergence, shoot length, root length, fresh weight and dried weight.

Keywords: Rice, bakanae disease, *Fusarium moniliforme*, essential oils, control

บทคัดย่อ: จากการตรวจหาเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคถอดผักตบขำ จากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น พบเชื้อรา *F. moniliforme* ร้อยละ 13.50 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมน้ำมันหอมระเหย พบว่าน้ำมันจากกานพลู อบเชยและเจอราเนียมที่ความเข้มข้น 400 500 และ 1,400 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุได้ 100% และเมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 3 ชนิดไปแช่เมล็ดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อความงอกของเมล็ด การควบคุมโรคและการเจริญเติบโตของต้นกล้า พบว่ามีเพียงน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูเท่านั้นที่ให้ผลดีที่สุด โดยสามารถลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ด และช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ความงอกในแปลง ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้า

คำสำคัญ: ข้าว โรคถอดผักตบขำ *Fusarium moniliforme* น้ำมันหอมระเหย การป้องกันกำจัด

^{1/}ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200.

^{1/}Department of Plant Phthology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

โรคยอดผักกาดของข้าว เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* เป็นโรคที่พบระบาดทั่วโลกที่มีการปลูกข้าว และทำให้ปริมาณของผลผลิตข้าวลดลงมาก (Ou, 1985) เชื้อราสาเหตุโรคสามารถแพร่ระบาดได้หลายทาง สำหรับการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ เชื้อราสาเหตุติดมากับเมล็ด ส่งผลกระทบตั้งแต่ในด้านความงอกของเมล็ดที่ทำให้ความงอกของเมล็ดลดลง การติดเชื้อหรือการเข้าทำลายเมล็ดนั้นทำให้เมล็ดเน่าตายก่อนงอก ตลอดจนต้นกล้าปกติที่มีปริมาณน้อยลงเนื่องจากพบลักษณะอาการของระยะต้นกล้า ต้นกล้าจะเกิดอาการยืดยาวผิดปกติ (Booth, 1971) ต้นข้าวเขียวช้ำ มักยางปล้องและมีรากเกิดขึ้นที่ข้อต่อของลำต้น รากเน่า และถ้าเป็นโรครุนแรงต้นกล้าข้าวจะตาย ถ้าเกิดโรคไม่รุนแรง อาการจะแสดงหลังจากย้ายกล้าไปปักดำแล้ว โดยต้นที่เป็นโรคจะสูงกว่าต้นข้าวปกติ ใบมีสีเขียวช้ำ บางครั้งพบกลุ่มของเส้นใยสีขาวหรือสีชมพูตรงบริเวณข้อที่ยางปล้อง และต้นข้าวจะตายหลังจากนั้น

การป้องกันกำจัดโรคส่วนใหญ่ใช้สารเคมีคลุกเมล็ดในการควบคุมโรคในระยะกล้าและฉีดพ่นในแปลงปลูก แต่เนื่องจากสารเคมีหลายชนิดมีพิษตกค้างเป็นอันตรายต่อคนและสัตว์เลี้ยงอย่างรุนแรง ประกอบกับพบว่าเชื้อราสาเหตุอาจสามารถเกิดความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อราได้ (Ogawa, 1988) จึงได้มีการค้นหาวิธีการในการป้องกันกำจัดโดยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีให้มากที่สุด การใช้สารสกัดจากพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืช สิริวิภา (2536; อ้างโดย สุคนธ์ทิพย์, 2543) ได้ใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืช 18 ชนิด นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของพริกและ *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรกคโนสของมะม่วง พบว่าน้ำมันหอมระเหยทุกความเข้มข้นจากตะไคร้ ตะไคร้หอม ผักขวย กะเพรา กานพลู สะระแหน่ และจันทร์เทศ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ได้ 100% ส่วนน้ำมันหอมระเหยทุกความเข้มข้นจากตะไคร้ ตะไคร้หอม ผักขวย กะเพรา กานพลู สะระแหน่ และไพลสามารถ

ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ 100% เช่นกัน

Hammer *et al.* (1999) และ Dorman and Deans (2000) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู อบเชย สะระแหน่ ออริกาโน กระเทียม ตะไคร้หอม และไทม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากไทม์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด เช่น *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* และ *Penicillium chrysogenum* ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 100-1,000 ppm

อนงค์นาถ (2547) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 11 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดของกะหล่ำปลี พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม ตะไคร้ต้น และเปปเปอร์มินต์ที่มีความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราได้ 100 % และยังพบว่าน้ำมันตะไคร้หอมและตะไคร้ต้นสามารถช่วยลดการติดเชื้อของเมล็ด เพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ความงอกใฝ่พื้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้ากะหล่ำปลีได้ดี

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการนำเอา น้ำมันหอมระเหยจากพืชบางชนิด มาใช้ควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ตลอดจนผลกระทบต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า เพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชทดแทนการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และเชื้อราอื่นๆ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น (Blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) นำมาเพาะเมล็ดจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด นำเมล็ดที่เพาะนี้ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ($30\pm 2^{\circ}\text{C}$) เป็นเวลานาน 7 วัน

จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดและปริมาณของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดภายใต้กล้อง Stereo microscope ทำการจำแนกชนิดของเชื้อราภายใต้กล้อง Compound microscope

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium moniliforme*

นำน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดคือ กานพลู (clove) และอบเชย (cinnamon) มาผสมกับอาหาร PDA โดยใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาณ 10 20 30 40 และ 50 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้น 100 200 300 400 และ 500 ppm ส่วนน้ำมันหอมระเหย อีก 3 ชนิดคือ เจอร์ราเนียม (geranium) ลาเวนเดอร์ (lavender) มาร์จอรัม (marjoram) ใช้ micropipette ดูดน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดปริมาณ 50 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครลิตร ผสมในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 500 1,000 1,500 2,000 2,500 3,000 3,500 4,000 4,500 และ 5,000 ppm เทส่วนผสมลงในจานอาหาร จานละ 20 มิลลิลิตร โดยทำการกรรวิธีละ 5 ซ้ำ แล้วย้ายชิ้นส่วนของเชื้อรา *F. moniliforme* ลงตรงกลางจานอาหาร บันทึกผลขนาดโคโลนีของเชื้อราอายุ 10 วันของทุกซ้ำ นำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้สูตร (เกษม, 2532)

$$\text{การยับยั้ง (\%)} = \left(\frac{A-B}{A} \right) \times 100$$

A = เส้นผ่าศูนย์กลางชุดควบคุม

B = เส้นผ่าศูนย์กลางชุดทดสอบ

จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งของแต่ละซ้ำ นำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการงอก การเจริญเติบโต และการเกิดโรคในระยะต้นกล้าข้าว

การทดลองนี้ใช้ชนิดของน้ำมันหอมระเหย และระดับความเข้มข้นเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยนำแต่

ละชนิดทุกความเข้มข้นในสารละลายน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมกับสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *F. moniliforme* เข้มข้น 2×10^7 สปอร์/มิลลิลิตร ในปริมาตรเท่ากัน นำเมล็ดข้าวไปปลูกเชื้อโดยการแช่ในส่วนผสมดังกล่าวนาน 2 ชั่วโมง แล้วฝังเมล็ดให้แห้ง แบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 นำไปเพาะบนกระดาษขึ้น จากนั้นทำการตรวจหาการติดเชื้อบนเมล็ดและผลต่อความงอกของเมล็ดในจานทดลอง และในส่วนที่ 2 ทำการตรวจหาความงอกโผล่พื้นดิน ต้นกล้าปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ 28 วัน

กรรมวิธีในการทดลอง

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 2 ชุดควบคุม (ปลูกเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด ลำดับที่ 1 (จากผลการทดลองที่ 2)

กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด ลำดับที่ 2 (จากผลการทดลองที่ 2)

กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อ + น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่ำสุด โดยให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงที่สุด ลำดับที่ 3 (จากผลการทดลองที่ 2)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น ผลปรากฏว่าพบเชื้อราทั้งหมด 11 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* 13.50 % และพบเชื้อราอื่นๆ ดังนี้ *Aspergillus flavus* (4.00 %) *Bipolaris oryzae* (2.25 %), *Penicillium* sp. (2.25 %), *Xylaria* sp. (1.25 %), *Trichoderma* sp. (1.00 %), *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata*, *Trichoconis padwickii* (0.50 %), *Aspergillus glaucus* และ unknown fungus (0.25 %) (ตารางที่ 1)

Table 1 Percentage of fungi associated with seed of rice cv. KDML 105

Fungi	Percentage ^{1/}
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.25
<i>A. niger</i>	0.50
<i>A. flavus</i>	4.00
<i>Bipolaris oryzae</i>	2.25
<i>Curvularia lunata</i>	0.50
<i>Fusarium moniliforme</i>	13.50
<i>Penicillium</i> sp.	2.25
<i>Trichoconis padwickii</i>	0.50
<i>Trichoderma</i> sp.	1.00
<i>Xylaria</i> sp.	1.25
Unknown fungus	0.25

^{1/} Each value is a mean of 4 replicates of 400 seeds.

โดยเชื้อราที่พบนี้ *F. moniliforme* และ *B. oryzae* เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคยอดผกตาบและโรคใบจุดสีน้ำตาลในข้าว ตามลำดับ และสามารถติดมากับเมล็ดข้าวได้เสมอ (สมคิด, 2532; Ou, 1985)

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Fusarium moniliforme*

จากการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ น้ำมันกานพลู อบเชย มาจอรา ลาเวนเดอร์ และเจอรานิยม ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยทดสอบเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA ผสมน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดในอัตราความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ ที่ความเข้มข้น 500 – 5,000 ppm พบว่า น้ำมันเจอรานิยมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้ดีที่สุดคือที่ความเข้มข้น 1,500 ppm เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตพบว่าให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งได้ตั้งแต่ 67 – 100 % รองลงมาคือ มาร์จอราแม (58 - 93%) และลาเวนเดอร์ (49 - 86%) (ตารางที่ 2) ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 100 – 500

ppm พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100% ที่ความเข้มข้น 400 ppm ส่วนอบเชยนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100% ที่ความเข้มข้น 500 ppm (ตารางที่ 3 และภาพที่ 1) และจากการที่น้ำมันเจอรานิยมสามารถให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญได้ถึง 100 % ที่ความเข้มข้นเพียง 1,500 ppm จึงหาความเข้มข้นที่อยู่ระหว่าง 1,000 – 1,500 ppm โดยเริ่มต้นที่ 1,100 – 1,500 ppm พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ 100 % ได้ในความเข้มข้นที่ 1,400 ppm (ตารางที่ 3)

การทดลองที่ 3 การศึกษาผลต่อการงอก การเจริญเติบโต และการเกิดโรคในระยะต้นกล้า

การเพาะบนกระดาดขึ้น

ผลจากการเพาะบนกระดาดขึ้นของกรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดด้วยเชื้อรา *F. moniliforme* และ แคมลิตินในน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 3 ชนิด พบว่าน้ำมันมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกให้แก่เมล็ดข้าวดีที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ ที่แคมลิตินด้วยน้ำมันหอมระเหยด้วยกัน คือน้ำมันกานพลู โดยให้ความงอกของเมล็ดสูงถึง 99 % แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อและกรรมวิธีที่ปลูก

Table 2 Effectiveness of 3 essential oils at different concentrations mixed with PDA on growth inhibition of *Fusarium moniliforme* after 10 days of incubation.

Treatment	Growth inhibition (%) ^{1/} at different concentrations (ppm)									
	500	1,000	1,500	2,000	2,500	3,000	3,500	4,000	4,500	5,000
PDA + Geranium oil	67.11	90.22	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
PDA + Lavender oil	49.78	54.56	57.33	60.67	64.67	64.67	71.89	75.44	81.11	86.11
PDA + Marjoram oil	57.89	60.78	67.44	73.44	74.33	80.78	86.11	89.00	89.00	93.33
PDA (Control)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
LSD _{0.05}	6.71	CV _(a) (%)		15.21	CV _(b) (%)		13.39			

^{1/} Results showed the average of 5 replications.

เชื้อแล้วแช่เมล็ดด้วยกรรมวิธีน้ำมันผสมกับแอลกอฮอล์ รองลงมาคือ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วย น้ำมันอบเชย ซึ่งมีความงอกของเมล็ด 68 % แต่น้ำมัน เจอรานิยมันทำให้เมล็ดข้าวไม่สามารถงอกได้เลย (ตาราง ที่ 4) ส่วนผลน้ำมันหอมระเหยต่อการติดเชื้อของเมล็ด พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมัน อบเชยและน้ำมันเจอรานิยมมีประสิทธิภาพช่วยลดการเข้า ทำลายของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด โดยไม่มีเปอร์เซ็นต์การ ติดเชื้อของเมล็ดเลย ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติจากทุกกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อที่เมล็ด รองลงมาคือ กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลู ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ด 13.50% (ตารางที่ 4) สำหรับผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อเปอร์เซ็นต์ของ ต้นกล้าผิปกติ พบว่ากรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่ เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลูและอบเชยมีประสิทธิภาพช่วยลด เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิปกติได้ดีที่สุด ไม่แตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ และกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อแล้วแช่เมล็ดด้วยกรรมวิธีน้ำมันผสม แอลกอฮอล์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิปกติ 2 4 1 และ 2 % ตามลำดับ แต่แตกต่างจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อ ที่เมล็ด โดยพบว่าไม่มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดสูงสุดคือ 95.25 % และต้นกล้าผิปกติสูงถึง 50 % (ตารางที่ 4)

การเพาะในดินอบฆ่าเชื้อ

ผลจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ พบว่า กรรมวิธีของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมัน กานพลู มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกในแปลงให้แก่ ต้นกล้าข้าวได้ดีที่สุดไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีที่ ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันผสม แอลกอฮอล์ รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย โดยมีความงอกใน แปลง 97 99 และ 81 % ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียวพบว่าการวิธี ของเมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันอบเชยให้ ความงอกที่ต่ำกว่าชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 5) ส่วนผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละ ชนิดต่อเปอร์เซ็นต์ของต้นกล้าผิปกติ พบว่ากรรมวิธีของ เมล็ดที่ปลูกเชื้อและแช่เมล็ดด้วยน้ำมันกานพลู มี ประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิปกติได้ดีที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น ๆ

รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้า ผิปกติ 5 และ 8 % ตามลำดับ (ตารางที่ 5) สำหรับการ ทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชแต่ละชนิดต่อ ความยาวลำต้นของต้นกล้าข้าว จากการการเปรียบเทียบ ผลทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ด ด้วยน้ำมันอบเชยและน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพช่วย

Table 3 Percent inhibition of *Fusarium moniliforme* grown on concentrations.

Treatment	Concentration (ppm)
PDA + Clove oil	100
	200
	300
	400
	500
PDA + Cinnamon oil	100
	200
	300
	400
	500
PDA + Geranium oil	1,100
	1,200
	1,300
	1,400
	1,500
PDA	
LSD _{0.05}	= 6.57 CV (%)

^{1/} Results showed the average of 5 replications.

^{2/} Means in column followed by the same letter are not significantly different.

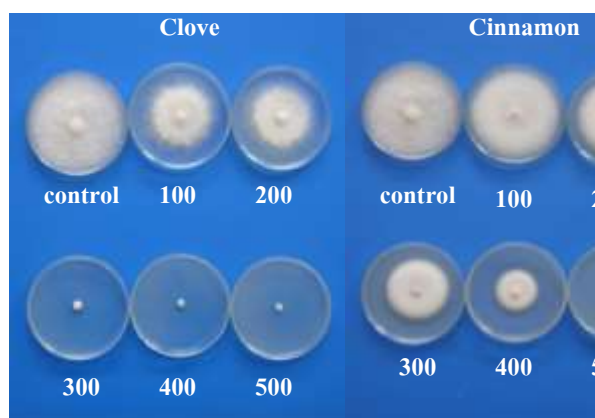


Table 4 Effect of essential oils on seed germination, seedling growth and disease incidence of *Fusarium moniliforme* in moist petridis

Treatment	Seed germination (%)
Control (uninoculated)	99.50 a
Control (inoculated)	97.25 b
Inoculated + water + alcohol	99.00 a
Inoculated + clove oil	98.75 a
Inoculated + cinnamon oil	67.50 c
Inoculated + eucalyptus oil	60.00 c

CV (%) ผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหย

จากพืชบางชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ

เชื้อรา *F. moniliforme* และช่วยเพิ่มความแข็งแรงของต้น

กล้าข้าวด้วย ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากในน้ำมันหอม

ระเหยมีสารประกอบที่สำคัญบางชนิดที่มีคุณสมบัติ

สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยสารเหล่านี้

อาจเป็น thymol, carvacol, cinnamic aldehyde และ allyl

isothiocyanate เป็นต้น (Basilico and Basilico, 1999)

สรุป

จากการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 5 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อรา *F. moniliforme* พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 100 % ที่ความเข้มข้นเพียง 400 ppm รองลงมาคือ อบเชย 500 ppm และเจอรานิยม 1,400 ppm สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชต่อความงอกของเมล็ด การติดเชื้อของเมล็ด และการเกิดโรคของต้นกล้าข้าวจากการเพาะบนกระดาษขึ้น พบว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดช่วยเพิ่มความงอกให้แก่

เมล็ดข้าว ลดการติดเชื้อของเมล็ด และลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่นๆ แต่ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีของชุดควบคุมที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย แต่ให้เปอร์เซ็นต์ความงอกที่ต่ำกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ไม่พบการติดเชื้อบนเมล็ดเลย ให้ต้นกล้าผิดปกติในอัตราที่ต่ำ ส่วนน้ำมันเจอรานิยมั้นเมล็ดไม่สามารถงอกได้เลยทั้งหมด และไม่มี

เกษม สร้อยทอง. 2532. การใช้ *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคใบไหม้ของข้าวโพดโดยชีววิธี. วารสารโรคพืช 9(1): 28-33.

สุนันท์ทิพย์ สมบัติ. 2543. ผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรในการควบคุมโรคใบจุดของข้าวโพด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 95 หน้า.

Table 5 Effect of 3 essential oils on emergence and seedling vigour of rice seed inoculated with *Fusarium moniliforme* in sterilized soil.

Treatment	Emergence ^{1/} (%)	Shoot length ^{1/} (cm)	Root length ^{1/} (cm)	Fresh weight ^{1/} (g)	Dry weight ^{1/} (g)
Control (uninoculated)	93.50 b ^{2/}	27.63 b	8.80 c	3.50 ab	0.55 b
Control (inoculated)	88.25 c	27.42 b	7.85 c	3.24 b	0.52 b
Inoculated + water + alcohol	98.75 a	28.27 ab	13.64 a	3.70 a	0.62 a
Inoculated + clove oil	97.00 a	29.43 a	11.89 b	3.87 a	0.66 a
Inoculated + cinnamon oil	80.75 d	29.49 a	8.82 c	3.58 ab	0.62 a
Inoculated + geranium oil	0.00 e	0.00 c	0.00 d	0.00 c	0.00 c
LSD _{0.05}	2.19	1.54	1.22	0.38	0.05
CV (%)	2.56	4.38	9.67	8.62	7.28

^{1/} Each value is a mean of 4 replicates.

^{2/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

วารสารเกษตร 23(1): 49-57 (2550)

การติดเชื้อของเมล็ดอีกด้วย อาจเนื่องจากน้ำมันเจอรานิยมมีความเข้มข้นไม่เหมาะสมกับเมล็ด ส่วนผลจากการเพาะในดินอบฆ่าเชื้อ พบว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกแปลง ต้นกล้าผิดปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ น้ำมันอบเชย และน้ำมันเจอรานิยม ที่ให้ผลในด้านความงอกลดลงตามลำดับ

สมคิด ดิสภาพร. 2532. ขาวนาปราบโรคข้าว. กลุ่มงานวิจัยโรคข้าวและวัชพืชเมืองหนาว กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

อนงค์ นาด แต่เชื้อสาย. 2547. การถ่ายทอดโรคความสามารถในการทำให้เกิดโรคและการป้องกันกำจัดของ *Alternaria brassicicola* ที่ติดมากับเมล็ดกะหล่ำปลี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 108 หน้า.

Basilico, M.Z. and J.C. Basilico. 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth

เอกสารอ้างอิง

-
- and ochratoxin A production. Letters in Applied Microbiology 29(4): 238-241.
- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. 58 pp.
- Dorman, H.J.D. and S.G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antimicrobial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88(2): 308-316.
- Hammer, K.A., C.F. Carson and T.V. Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86(6): 985-990.
- International Seed Testing Association. 1999. International Rules for Seed Testing; Annexes 1976. Seed Sciences and Technology 4: 3-49.
- Ogawa, K. 1988. Damage by "bakanae" disease and its chemical control. Japan Pesticide Information 52:13-15.
- Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed, Commonwealth Mycological Institute, Kew. 380 pp.
-

ประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าว ขาวดอกมะลิ 105 ในการควบคุมโรคยอดผักดาบในต้นกล้าข้าว

Efficacies of Antagonistic Fungi from Rice Seeds cv. KDML 105 for Controlling Bakanae Disease in Rice Seedling

สายชล โนชัย^{1/} และ สมบัติ ศรีชูวงศ์^{1/}
Saichon Nochai^{1/} and Sombat Srichuwong^{1/}

Abstract: Detection of seed borne fungi from seeds of rice cv. Khao Dawk Mali 105 (KDML 105) was conducted by using Blotter method. *Fusarium moniliforme* at 13.50 % tested seed was detected and other ten species of fungi were also isolated from the same seed lot. They were brought to test for their antagonistic effects against *F. moniliforme* by Dual culture method. It was found that *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger* and an unknown fungus gave the best results, respectively. The selected antagonistic fungi were again challenged with the *F. moniliforme* on rice seeds. Among them, *Trichoderma* sp. had the abilities to reduce the incidence of the disease and increase seed germination, seedling emergence, shoot length, root length, fresh weight and dried weight of seedlings.

Keywords: Rice, bakanae disease, *Fusarium moniliforme*, antagonistic fungi, biocontrol

บทคัดย่อ: จากการตรวจหาเชื้อรา *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคยอดผักดาบจากเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น พบเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดข้าวร้อยละ 13.50 และเชื้อราอื่นๆ อีก 10 ชนิดเมื่อนำเชื้อราทั้ง 10 ชนิด ที่แยกได้ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp., *Aspergillus niger* และ unknown fungus ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งดีกว่าชนิดอื่นๆ ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อราที่คัดเลือกแล้วไปทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดข้าว พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ให้ผลดีกว่าเชื้อราอีก 2 ชนิด โดยสามารถลดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ด และช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด ความงอกในแปลง ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้นกล้า

คำสำคัญ: ข้าว โรคยอดผักดาบ *Fusarium moniliforme* เชื้อราปฏิปักษ์ การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี

^{1/}ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200.

^{1/}Department of Plant Phthology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

อุปสรรคสำคัญของการปลูกข้าวคือปัญหาของโรค ซึ่งโรคที่เกิดกับข้าวมักมีสาเหตุมาจากหลายประการ และโรคที่สำคัญโรคหนึ่งที่เกิดกับข้าวคือ โรคถอดฝักดาบ สาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* Sheldon (ระยะ anamorph) หรือ *Gibberella fujikuroi* (ระยะ telomorph) พบระบาดมากในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และพบระบาดประปรายในภาคกลาง (สมคิด, 2532) โรคที่เกิดในระยะต้นกล้าอาจทำให้ต้นกล้าแห้งตาย ต้นข้าวที่เป็นโรคจะเรียวกว่าปกติ สีซีดและมีอาการอย่างปล้อง มีรากเกิดขึ้นที่ข้อต่อของลำต้นตรงระดับน้ำ บางกรณีข้าวจะไม่ย้ายปล้องแต่รากจะเน่า ถ้าเป็นรุนแรงกล้าข้าวจะตายได้ (Ou, 1985)

การนำจุลินทรีย์มาใช้เพื่อป้องกันกำจัดโรคพืช นั้น เป็นวิธีการที่นำผลจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติซึ่งตามปกติจะมีการควบคุมปริมาณของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ด้วยกันเองอยู่แล้ว การศึกษาและค้นคว้ามีเพิ่มขึ้นเมื่อสารเคมีที่ใช้เพื่อการป้องกันกำจัดโรคพืช ทำให้เกิดมีผลตกค้างเป็นพิษต่อสภาพแวดล้อม ตลอดจนเชื้อโรคพืชเองสามารถปรับตัวต่อต้านหรือดื้อต่อสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช กลุ่มของเชื้อราที่นำมาศึกษาเพื่อป้องกันกำจัดนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อราในดิน และโดยเฉพาะกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็น saprophytic behavior คือ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้โดยอาศัยเศษซากสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วเป็นอาหาร ตัวอย่างเช่น ในสกุล *Trichoderma*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Actinomycetes* เป็นต้น คุณลักษณะของเชื้อราที่นิยมนำมาทดลองใช้ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีคุณสมบัติของการสร้างสารพิษ (toxin) หรือเอนไซม์ (enzyme) ซึ่งสามารถฆ่าทำลายเชื้อราอื่น ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราสาเหตุโรคพืช นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติในการเป็นปรสิต (parasite) อีกด้วย เชื้อราที่มีผู้นิยมใช้กันมากเพื่อนำมาศึกษาควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช เช่น ในสกุล *Trichoderma* ซึ่งประกอบด้วยชนิดต่าง ๆ เช่น *T. harzianum*, *T. viride*, *T. hamatum* เป็นต้น เชื้อราสกุลนี้มีคุณสมบัติครบถ้วนในการเป็นปฏิปักษ์ที่ดี กล่าวคือ สามารถสร้างสารพิษและเป็นปรสิตโดยตรง

แล้วแต่ชนิด Mew and Kommedahl (1972) รายงานว่าการคลุกเมล็ดข้าวโพดด้วยสปอร์ของเชื้อรา *Chaetomium globosum* ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคจากเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Penicillium* sp. ลดลงจาก 60 เปอร์เซ็นต์เหลือ 9 เปอร์เซ็นต์ Yeh and Sinclair (1980) รายงานว่าได้แยกเชื้อรา *C. cupreum* จากเมล็ดถั่วเหลืองนำมาทดสอบกับเชื้อรา *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis* sp. และ *Rhizoctonia solani* โดยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อรา *C. cupreum* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราดังกล่าวได้ Gohil and Vala (1996) ศึกษาผลของจุลินทรีย์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยใช้แบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ผลการทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งโรคเหี่ยวในอ้อยได้ เชื้อราปฏิปักษ์จะขึ้นปกคลุมและทำให้เชื้อสาเหตุยุบตัวลง

ส่วนในประเทศไทยมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราปฏิปักษ์ด้วย โดยเกษม (2533) รายงานว่าเมื่อนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ได้แก่เชื้อรา *C. globosum*, *C. cochioidea* และ *C. cupreum* ทั้งโดยการใช้สปอร์คลุกเมล็ดข้าวและใช้สารสกัดจากจุลินทรีย์ปฏิปักษ์พบว่าสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุของโรคติดต่อทางเมล็ดพันธุ์ของข้าวได้หลายชนิด อาทิเช่น *Pyricularia oryzae*, *Fusarium moniliforme*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia oryzae* และ *R. solani* ได้เป็นผลสำเร็จ

ชนินทร (2545) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ 50 ไอโซเลทจากต้นข้าว เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ในข้าว้นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้ในช่วง 44.54-58.76 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำเมล็ดข้าวที่คลุกด้วยเชื้อราเอนโดไฟต์ปลูกในดิน พบว่าเมล็ดข้าวมีความงอกสูงกว่าเมล็ดข้าวในชุดควบคุม นอกจากนั้นจวงจันทร (2546) ได้นำเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* 3 isolates ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวและ *Gliocladium virens*, *T. harzianum* รวมทั้ง *T. viride* มาทดสอบกับเชื้อรา *F. moniliforme* พบว่า เชื้อปฏิปักษ์ทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้ในช่วง 48.76-52.19 เปอร์เซ็นต์

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการแยกเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เพื่อนำมาคัดเลือกประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคและโรคที่ติดมากับเมล็ด ตลอดจนผลกระทบต่อความงอกและความแข็งแรงของต้นกล้า เพื่อใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการควบคุมโรคพืชโดยใช้วิธีทดแทนการใช้สารเคมี

อุปกรณ์และวิธีการ

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

นำเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *F. moniliforme* และเชื้อราอื่นๆ ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น (Blotter method) ตามมาตรฐานสากลของ International Seed Testing Association (ISTA, 1999) และทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์เก็บเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual culture

นำเชื้อรา *F. moniliforme* และเชื้อราจาก stock culture มาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อรา *F. moniliforme* โดยวิธี Dual culture บนอาหาร PDA โดยทำการวิธีละ 5 ซ้ำ บันทึกการเจริญของเชื้อราสาเหตุ โดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งรัศมีการเจริญ (percent inhibition of radial growth หรือ PIRG) ของเชื้อสาเหตุจากสูตร

$$\text{PIRG} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

โดย R_1 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุในงานชุดควบคุม

R_2 คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราสาเหตุด้านที่เจริญไปทางเชื้อราทดสอบ

คัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุตั้งแต่ 50 % ขึ้นไปเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคยอดผักตบโดยการเพาะบนกระดาษขึ้นและในดินอบฆ่าเชื้อ

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 2 และเชื้อรา *F. moniliforme* มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหาร PDA จากนั้นนำมาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ให้ได้ความเข้มข้น 10^6 - 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *F. moniliforme* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดปริมาณเท่ากัน นำเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 0.1% Sodium hypochlorite นาน 5 นาที แล้วนำเมล็ดไปแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *F. moniliforme* ที่ผสมกับเชื้อราปฏิปักษ์แต่ละชนิดนาน 2 ชั่วโมง ผึ่งเมล็ดให้แห้ง จากนั้นแบ่งเมล็ดออกเป็น 2 ส่วน นำเมล็ดพันธุ์ที่เตรียมไว้แต่ละส่วนไปเพาะบนกระดาษขึ้นและเพาะในดินฆ่าเชื้อ ทำกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 100 เมล็ด วางแผนการทดลองแบบ Split Plot in CRD ตรวจหาปริมาณของเชื้อรา *F. moniliforme* บนเมล็ดที่เพาะบนกระดาษขึ้น ความงอกของเมล็ดในงานทดลองและความงอกในแปลง ต้นกล้าผิดปกติ ความยาวลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง จากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105

ตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 โดยวิธีเพาะบนกระดาษขึ้น พบเชื้อราทั้งหมด 11 ชนิด ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบเชื้อรา *Fusarium moniliforme* 13.50 % และพบเชื้อราอื่น ๆ ดังนี้

Aspergillus flavus (4.00 %) *Bipolaris oryzae* (2.25 %), *Penicillium* sp. (2.25 %), *Xylaria* sp. (1.25 %), *Trichoderma* sp. (1.00 %), *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata*, *Trichoconis padwickii* (0.50 %), *Aspergillus glaucus* และ unknown fungus (0.25 %) ตามลำดับ เชื้อราที่พบครั้งนี้มีเพียง 2 ชนิดที่มีรายงานว่า เป็นสาเหตุของโรค ซึ่งได้แก่ *F. moniliforme* และ *B. oryzae* (สมคิด, 2532; Ou, 1985)

การศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium moniliforme* บนอาหาร PDA โดยวิธี Dual culture

จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อรา *F. moniliforme* บนอาหาร PDA พร้อมกับเชื้อราทดสอบ 10 ชนิด มีเชื้อรา 3 ชนิดได้แก่ *Trichoderma* sp., *A. niger* และ unknown fungus ที่แสดงการเป็นเชื้อราปฏิปักษ์โดยมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *F. moniliforme* ได้ดีตามลำดับ เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* พบว่า *Trichoderma* sp. ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด รองลงมาได้แก่ *A. niger* และ unknown fungus ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 81.40, 68.80 และ 63.60 % ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

และจากการสังเกตลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยเชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดพบว่าเชื้อรา *A. niger* ทำให้เส้นใยของเชื้อราที่มีสีเข้มขึ้นเมื่อดูด้านใต้จานอาหาร พบว่า เชื้อรา *F. moniliforme* มีวงขอบสีชมพูเหลือง และเชื้อราปฏิปักษ์จะเจริญขึ้นบนเส้นใยของเชื้อราสาเหตุ ส่วน unknown fungus นั้นเส้นใยจะเว้นขอบบริเวณเชื้อสาเหตุไว้เล็กน้อย แต่ในบริเวณที่เส้นใยสัมผัสกันเส้นใยของเชื้อราสาเหตุมีสีเข้มคล้ำ และเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุหยุดการเจริญและเชื้อรา ทำให้เส้นใยของเชื้อราสาเหตุยุบตัวลง (ภาพที่ 1)

นอกจากนั้นยังพบลักษณะการยับยั้งระหว่างเชื้อราที่นำมาทดสอบกับเชื้อรา *F. moniliforme* มี 3 ลักษณะคือ เชื้อราหรือเชื้อราปฏิปักษ์จะเจริญชนกับเชื้อราสาเหตุแต่ไม่เจริญทับกัน ลักษณะที่สองคือ เชื้อราปฏิปักษ์เจริญทับเชื้อราสาเหตุ และลักษณะที่สามคือ จะ

เกิด clear zone ระหว่างเชื้อราปฏิปักษ์และเชื้อราสาเหตุ โดยทั้งสามลักษณะส่งผลให้เชื้อราสาเหตุเจริญเติบโตช้าลงหรือถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดยเชื้อราหรือเชื้อราปฏิปักษ์มีคุณสมบัติต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโต ซึ่งจากการทดลองนี้เชื้อราที่ให้ผลการยับยั้งแบบเจริญทับคือ *Trichoderma* sp., *A. niger* และ unknown fungus และเชื้อราที่ให้ผลในการเกิด clear zone คือ *A. glaucus* ส่วนเชื้อรา ชนิดอื่น ๆ ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะเจริญชนเชื้อราสาเหตุ

การศึกษาผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการเข้าทำลายเมล็ด ความงอกเมล็ด และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคถดถอยโดยการเพาะบนกระดาษชื้นและในดินอบฆ่าเชื้อ

การเพาะบนกระดาษชื้น

ผลจากการเพาะเมล็ดบนกระดาษชื้น พบว่าเชื้อราปฏิปักษ์ทุกชนิดช่วยเพิ่มความงอกของเมล็ดข้าว เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่ในสปอร์แขวนลอย เพียงอย่างเดียว โดยเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกให้แก่เมล็ดข้าวได้ดีที่สุด คือ *A. niger* รองลงมาคือ unknown fungus และ *Trichoderma* sp. โดยในกรรมวิธีที่แช่เมล็ดใน สปอร์แขวนลอย ของ *A. niger*, unknown fungus และ *Trichoderma* sp. ให้ความงอกของเมล็ด 100.0, 99.75 และ 99.50% ตามลำดับ แต่เชื้อราทั้ง 3 ชนิดให้เปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ ส่วนผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการติดเชื้อของเมล็ด พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. และ *A. niger* มีประสิทธิภาพช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ด 31.25 % เท่ากันและไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเปอร์เซ็นต์ของต้นกล้าผิดปกติ พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติได้ดีที่สุด รองลงมาคือ unknown fungus และ *A. niger* โดยมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ 0.51, 1.26 และ 1.50% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุด

Table 1 Comparison of effectiveness of 10 fungi in inhibiting the growth of *Fusarium moniliforme* in Dual culture test.

Fungi	Growth inhibition ^{1/} (%)
<i>Aspergillus flavus</i>	52.40 c ^{2/}
<i>A. glaucus</i>	40.00 b
<i>A. niger</i>	68.80 f
<i>Bipolaris oryzae</i>	34.80 a
<i>Curvularia lunata</i>	58.40 d
<i>Penicillium</i> sp.	42.00 b
<i>Trichoconis padwickii</i>	39.60 b
<i>Trichoderma</i> sp.	81.40 g
Unknown fungus	63.60 e
<i>Xylaria</i> sp.	35.20 a
LSD _{0.05}	3.31
CV (%)	5.54

^{1/}Each value is a mean of 5 replications.

^{2/}Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

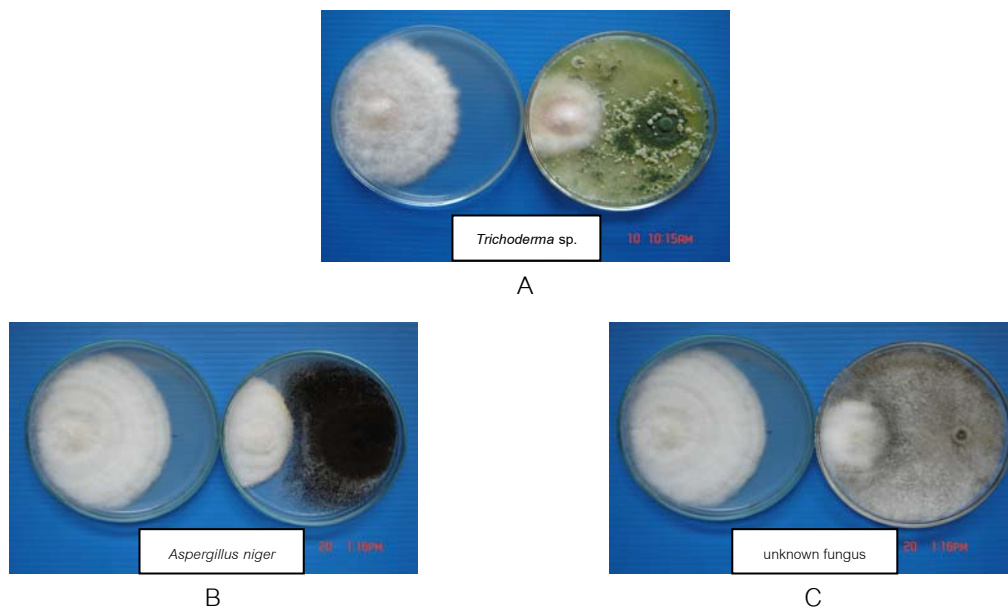


Figure 1 Antagonistic effect of *Trichoderma* sp. (A), *Aspergillus niger* (B) and unknown fungus (C) on *Fusarium moniliforme*.

Left plate : *F. moniliforme* culture

Right plate : Dual culture of the fungi

ควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว แต่เชื้อราปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ สำหรับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว พบว่าเมล็ดมีความงอกต่ำสุดคือ 97.25% มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของเมล็ดสูงสุดคือ 95.25% และต้นกล้าที่งอกนั้นให้ต้นกล้าผิดปกติถึง 49.43 % (ตารางที่ 2)

การเพาะในดินอบฆ่าเชื้อ

สำหรับผลจากการเพาะเมล็ดในดินอบฆ่าเชื้อ พบว่ากรรมวิธีปลูกเชื้อที่เมล็ดและแช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราปฏิปักษ์ทุกชนิด มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกในแปลงให้แก่ต้นกล้าข้าวได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว โดยพบว่า unknown fungus มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ *Trichoderma* sp. และ *A. niger* โดยมีความงอกของเมล็ด 97, 96 และ 96% ตามลำดับโดยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด ให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อแต่ไม่ต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ สำหรับผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพช่วยลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติได้ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีอื่น ๆ โดยกรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. มีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ 3.50% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของ unknown fungus และ *A. niger* ให้เปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติ 5.50 และ 8.50% ตามลำดับ โดย *A. niger* นั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่ปลูกเชื้อ สำหรับการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อความยาวลำต้นของต้นกล้าข้าว พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ให้ความยาวลำต้นของต้นกล้าสูงสุด และมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความยาวลำต้นของต้นกล้าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือ *A. niger* และ unknown fungus ตามลำดับ สำหรับการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อความยาวรากของต้นกล้าข้าว พบว่ากรรมวิธีที่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ให้ความยาวลำต้นของต้นกล้าสูงสุด และมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่ม

เปอร์เซ็นต์ความยาวรากของต้นกล้าแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือ *A. niger* และ unknown fungus ตามลำดับ จากการทดสอบผลของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อการเจริญของต้นกล้าข้าว จากการวัดน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง พบว่ากรรมวิธีที่แช่เมล็ดในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ให้น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งสูงสุด คือ 4.13 และ 0.66 กรัม ตามลำดับ รองลงมาคือ *A. niger* (3.64 และ 0.62 กรัม) และ unknown fungus (3.62 และ 0.58 กรัม) (ตารางที่ 3)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Chang *et al.* (1986); Kleifeld and Chet (1992) ที่กล่าวว่า การใช้เชื้อรา *Trichoderma* sp. สามารถช่วยส่งเสริมให้เมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ งอกได้เร็วขึ้นและจำนวนเมล็ดที่งอกมีมากขึ้น และ Baker (1988) ได้รายงานไว้ว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทำหน้าที่ในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชระดับรอง และผลิตสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชด้วย ซึ่งทำให้พืชสามารถเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยทั่วไปที่เกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี มี 4 ปัจจัยด้วยกันคือ พืชอาศัย (host plant) เชื้อโรค (pathogen) สิ่งแวดล้อมทางกายภาพ (physical environment) และเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

สรุป

การตรวจหาเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดทั้งที่ทำให้เกิดโรค (parasitic fungi) และไม่ทำให้เกิดโรค (saprophytic fungi) จากเชื้อราที่พบนี้มีเชื้อรา *F. moniliforme* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคที่สำคัญ ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. moniliforme* โดยเชื้อราปฏิปักษ์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ทดสอบโดยวิธี Dual culture พบว่าเชื้อรา *Trichoderma* sp. ให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด รองลงมาได้แก่ รองลงมาได้แก่ *A. niger* และ unknown fungus ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 81.40, 68.80 และ 63.60 % ตามลำดับ สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ต่อเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ด การติดเชื้อของเมล็ด และการเกิดโรคของต้นกล้าข้าวจากการเพาะบนกระดาษชื้น พบว่าเชื้อรา

Table 2 Effect of antagonistic fungi on seed germination, seed infection and abnormal seedling of rice seeds inoculated with *Fusarium moniliforme* in moist petridishes.

Treatment	Germination ^{1/} (%)	Seed infection ^{1/} (%)	Abnormal seedling ^{2/} (%)
Control (uninoculated)	99.50 a ^{3/}	10.25 c	0.76 b
Control (inoculated)	97.25 b	95.25 a	49.43 a
Inoculated + <i>Trichoderma</i> sp.	99.50 a	31.25 b	0.51 b
Inoculated + <i>Aspergillus niger</i>	100.00 a	31.25 b	1.50 b
Inoculated + unknown fungus	99.75 a	32.50 b	1.26 b
LSD _{0.05}	1.99	8.14	2.11
CV (%)	0.80	0.13	13.09

^{1/} Each value is a mean of 4 replications.

^{2/} Each value is a mean of 4 replicates of germinated seedling.

^{3/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

Table 3 Effect of antagonistic fungi on emergence and seedling vigour of rice seed inoculated with *Fusarium moniliforme* in sterilized soil.

Treatment	Emergence ^{1/} (%)	Shoot Length ^{1/} (cm)	Root Length ^{1/} (cm)	Fresh Weight ^{1/} (g)	Dry Weight ^{1/} (g)
Control (uninoculated)	93.50 a ^{2/}	27.64 b	8.80 bc	3.50 bc	0.55 cd
Control (inoculated)	88.25 b	27.43 b	7.85 c	3.24 c	0.52 d
Inoculated + <i>Trichoderma</i> sp.	95.75 a	30.16 a	13.30 a	4.13 a	0.66 a
Inoculated + <i>Aspergillus niger</i>	95.75 a	27.70 b	11.30 ab	3.64 b	0.62 ab
Inoculated + unknown fungus	96.50 a	27.59 b	11.00 ab	3.62 b	0.58 bc
LSD _{0.05}	3.02	2.22	2.68	0.33	1.95
CV(%)	2.13	5.25	17.03	6.17	5.44

^{1/} Each value is a mean of 4 replicates.

^{2/} Means in column followed by the same letter are not significantly different at P = 0.05 according to LSD.

ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มความงอกของเมล็ด ลดการติดเชื้อของเมล็ด และลดเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าผิดปกติได้ดี เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อเพียงอย่างเดียว แต่ให้ผลไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้

ปลูกเชื้อ ยกเว้นการติดเชื้อของเมล็ดที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับผลจากการเพาะในดินอบฆ่าเชื้อพบว่า *Trichoderma* sp. มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความงอกในแปลง ต้นกล้าผิดปกติ ความยาว

ลำต้น ความยาวราก น้ำหนักสด และน้ำหนักแห้งของต้น
กล้าข้าวได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *A. niger* และ unknown
fungus ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. 2533. วรรณนาการแนวความคิดเกี่ยวกับการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. วารสารศูนย์
บางพระ 27(3): 15-26.
- ชนินทร์ ดวงสอด. 2545. การควบคุมโรคยอดฝักดาบ
ของข้าวที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme*
โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ในข้าว. วิทยานิพนธ์วิทยา
ศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,
เชียงใหม่. 153 หน้า.
- จวงจันทร์ จำปาทอง. 2546. การควบคุมเชื้อ
Fusarium moniliforme ที่ติดมากับเมล็ด
ข้าวโดยเชื้อราปฏิปักษ์ สารชีวภัณฑ์ และ
โคโคซาน. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 64 หน้า.
- สมคิด ดิษฐาพร. 2532. ขบวนการปราบโรคข้าว. กลุ่ม
งานวิจัยโรคข้าวและธัญพืชเมืองหนาว กองโรค
พืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
กรุงเทพฯ. 116 หน้า.
- Baker, R. 1988. *Trichoderma* spp. as plant-growth
stimulants. Critical Rev. Biotechnol. 7: 97-106.
- Chang, Y.C., R. Baker, O. Kleifeld and I. Chet. 1986.
Increased growth of plant in the presence of
the biological control agent *Trichoderma*
harzianum. Plant Disease 70: 145-148.
- Gohil, V.P. and D.G. Vala. 1996. Antagonistic effect
of microorganism to *Fusarium moniliforme*.
Madras Agricultural Journal 83(6): 396-397.
- International Seed Testing Association (ISTA). 1999.
International Rules for Seed Testing;
Annexes 1976. Seed Sciences and
Technology 4: 3-49.
- Kleifeld. O. and I. Chet. 1992. *Trichoderma*
harzianum interaction with plants and effect
on growth response. Plant and Soil 144:
267-272.
- Mew, J.C. and T. Kommedahl. 1972. Interaction
among microorganism occurring naturally
and applied to pericarps of corn kernel.
Plant Disease 56: 861-863.
- Ou, S.H. 1985. Rice Disease. 2nd ed., Commonwealth
Mycological Institute, Kew. 380 pp.
- Yeh, C.C. and J.B. Sinclair. 1980. Effect of
Chaetomium cupreum on seed germination
and antagonism to other seedborne fungi of
soybean. Plant Disease 64: 468-470.

ผลของการอบรมเชิงบรรยายต่อความรู้และความตระหนัก
เกี่ยวกับการควบคุมโดยชีววิธีด้วยไรโซแบคทีเรียที่เร่งเสริม
การเจริญเติบโตของพืช ของเกษตรกรจังหวัดพิษณุโลก ประเทศไทย

Impact of a Lecture-based Intervention on Knowledge and
Awareness of Plant Growth Promoting Rhizobacteria as a Biological
Control Measure Among Farmers in Phitsanulok, Thailand

กัญชลี เจตียนนท์^{1/} ภิญญา เปลี่ยนบางช้าง^{2/} และ ปิยะรัตน์ นิมพิทักษ์พงศ์^{2/}
Kanchalee Jetiyanon^{1/}, Pinyupa Plianbangchang^{2/} and Piyarat Nimpitakpong^{2/}

Abstract: Misuse and overuse of pesticides have long been a serious problem in Thailand. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) has currently been a promising environmental-friendly alternative to synthetic pesticides in controlling plant diseases. The objectives of this study were to (1) investigate the effect of a lecture-based intervention on farmers' knowledge and awareness; and (2) examine the relationship between prior conditions and their knowledge and awareness of PGPR as a biological control measure. This one-group, pre-post, quasi-experimental study was conducted in Phitsanulok, Thailand. The intervention consisted of a one-day lecture/discussion and a field demonstration, with one-, three-, and six-month follow-ups. Thirty-two farmers participated in this study. The results indicated that the intervention significantly affected farmers' knowledge. In addition, the gain of knowledge was consistent in farmers of different age, gender, educational level, and frequency of pesticide use. However, the intervention could not create a significant difference on farmers' awareness, except a minor improvement in the awareness of pesticide harm. Changes of knowledge persisted to six months. Education was an important prior condition that determined the level of knowledge and awareness among participants. In conclusion, the lecture-based intervention had a significantly impact on farmers' knowledge of PGPR as a biological control measure.

Keywords: Diffusion of Innovations, intervention, Plant Growth Promoting Rhizobacteria, knowledge, awareness

^{1/} คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

^{1/} Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environmental Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

^{2/} คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

^{2/} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

บทคัดย่อ: การใช้สารปราบศัตรูพืชอย่างไม่เหมาะสมเป็นปัญหาสำคัญสำหรับประเทศไทย เมื่อไม่นานมานี้ ไวโรแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช (พีจีพีอาร์) ได้รับการพิสูจน์แล้วว่า เป็นทางเลือกในการควบคุมโรคพืชที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมมากกว่าสารเคมี วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อ (1) ศึกษาผลของโครงการอบรมที่มีต่อความรู้และความตระหนักของเกษตรกร และ (2) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยพื้นฐานกับความรู้และความตระหนักของเกษตรกรเกี่ยวกับการจัดการและควบคุมศัตรูพืชด้วยพีจีพีอาร์ การวิจัยนี้เป็นแบบกึ่งทดลอง ตัวอย่างกลุ่มเดียว ทดสอบก่อนและหลัง ดำเนินการในจังหวัดพิษณุโลก การอบรมประกอบด้วยการบรรยายและอภิปรายร่วมกับการเยี่ยมชมแปลงสาธิต ติดตามผลที่ 1 3 และ 6 เดือนหลังการอบรม มีเกษตรกรเข้าร่วมในการวิจัยทั้งสิ้น 32 ราย ผลการวิจัยพบว่า การอบรมสามารถเพิ่มความรู้ของเกษตรกรได้อย่างมีนัยสำคัญ เกษตรกรที่มีอายุ เพศ ระดับการศึกษา และความถี่ในการใช้สารปราบศัตรูพืชมีการเพิ่มขึ้นของความรู้ใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม การอบรมไม่สามารถเพิ่มความตระหนักของเกษตรกรได้อย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นความตระหนักต่ออันตรายของสารปราบศัตรูพืช ความรู้ที่เพิ่มขึ้นของเกษตรกรมีความคงทนถึง 6 เดือนหลังการอบรม การศึกษาไม่ใช่ปัจจัยพื้นฐานที่ทำนายระดับความรู้และความตระหนักของเกษตรกร โดยสรุป การอบรมเชิงบรรยายสามารถเพิ่มความรู้ของเกษตรกรเกี่ยวกับการจัดการและควบคุมศัตรูพืชด้วยพีจีพีอาร์

คำสำคัญ: การแพร่กระจายของนวัตกรรม การอบรม แบบที่เรียกว่ากินอิสระรอบรากพืชที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชความรู้ ความตระหนัก

Introduction

The use of chemical pesticides for plant disease control is widespread in Thailand since most farmers believe that they are the only option for maintaining the quality and quantity of their produces. During 1999-2004, the total quantity of imported pesticides increased from 51,344 to 99,839 tons, causing the escalated values from 6,417.46 to 10,372.07 million Baht (Office of Agricultural Economics, 2005). Besides negative economic impacts to the country, continuous misuse and overuse of pesticides cause dramatic impacts on human health and the environment (Food and Drug Administration, 2004).

Phitsanulok is located in the lower-northern region of Thailand. The province has the area of 10,815 sq km. The main source of incomes of its people come from agriculture, especially rice and

field crops. The majority of farmer in Phitsanulok was found to use pesticides aggressively and without proper protection (Kanato, 1998).

In recent years, microbial inoculant technology involving plant-beneficial microorganisms such as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) has drawn substantial attention from scientists around the world as a more environmentally-friendly method to regulate plant diseases compared to chemical agents (Kloepper *et al.*, 1986; van Peer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1992; Glick *et al.*, 1994; Raupach *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996). This innovation is currently one of the promising tools for sustainable plant production. Greenhouse and field studies in Phitsanulok have found PGPR to be effective in plant disease control (Jetiyanon and Kloepper., 2002; Jetiyanon *et al.*, 2003). The technology was ready to be transferred to farmers in the area. Unfortunately, numbers of

initiatives from both governmental and non-governmental entities to promote the adoption and diffusion of more sustainable agricultural technologies among farmers have been so far disappointing. Experiences from a large number of projects indicated that the problem of such failure lie in the incompatibilities of the innovation introduced with the adopters (Laper *et al.*, 1999). Appropriate knowledge and awareness of the innovation must be established among the adopters prior to the introduction of innovation.

The objectives of this study were: (1) to examine the effect of intervention on farmers' knowledge and awareness of PGPR as a biological control method; and (2) to examine the relationship between prior conditions (i.e., age, gender, educational level, and frequency of pesticide use) and knowledge and awareness of PGPR as a biological control measure among farmers in Phitsanulok.

Materials and Methods

This one-group, pre-post, quasi-experimental study was conducted between October 2004 and May 2005, as parts of an on-going project which attempts to persuade vegetable growers to switch from heavy chemical use to the adoption of PGPR technique. The study protocol was approved by Naresuan University Institutional Review Board.

The Intervention

Public outreaches to announce the intervention were conducted by the research team one month prior to the scheduling date. All farmers who expressed their interest were invited to join a one-day lecture/discussion and a field demonstration

at Naresuan University. Transportation was provided for those who had difficulty traveling to the location.

The one-day intervention consisted of two parts: (1) a lecture and group discussion by the researchers/innovators, and (2) a field demonstration. These activities were aimed at increasing knowledge and awareness of the innovation among participating farmers. The lecture/discussion was designed to include three types of knowledge about the innovation: awareness knowledge, how-to knowledge, and principles knowledge. Awareness knowledge was defined as information about the existence of an innovation. How-to knowledge was the information on how to use such innovation properly. Finally, principles knowledge was the information required to understand the functioning principles of the innovation. The lecture/discussion began with the principles knowledge including plant diseases and disease control, as well as general information on PGPR. The lecture/discussion then proceeded to the existence of the innovation (PGPR) and how it worked; the outcomes and advantages of PGPR in terms of plant growth promotion, disease resistance, and environmental friendliness. At the end, the how-to knowledge was introduced and field demonstration was carried out. All aspects of the lecture/discussion were made in lay terminology. During the lecture/discussion and field demonstration, farmers were given opportunities to discuss their ideas with the innovators and their peers.

The Measurements

Knowledge and awareness were examined by a brief questionnaire which was administered by a group of trained interviewers at pre-intervention,

immediately after the intervention, and at one, three, and six months after the intervention. The instrument was pilot tested to assess its reliability and validity in a sample of farmers in Phitsanulok.

The revised questionnaire comprised of ten questions on knowledge:

1. When is the appropriate time for safely harvesting agricultural produce after chemical application?
2. Can some fungi, bacteria, and virus in the environment be the cause of diseases in plants?
3. Can plants be induced against diseases?
4. What is "biological control?"
5. Can some fungi, bacteria, and virus in the environment be beneficial to the plants?
6. Is there any measure besides chemical application to control plant diseases?
7. What is "PGPR?"
8. What is the benefit of PGPR to the plants?
9. What is not the benefit of PGPR to the plants?
10. How should PGPR be applied to the plants?

Ten questions assessing awareness of the farmers:

1. In general, pesticides do not harm the farmers who apply them.
2. There should be some other alternatives to pesticides.
3. Pesticides can be resided in the soil and environment after application.
4. Pesticides are highly reliable in controlling pest.
5. Pesticides are cost-effective.
6. Pesticide-contaminated vegetables can be consumed without any harm.
7. Pesticide residues can be degraded rapidly in the environment.

8. Currently, farmers already have a good measure for plant diseases control.

9. Any alternative method does not affect the current use of pesticides.

10. In general, farmers appreciate their use of pesticides for plant diseases control more than any other measures.

In addition, farmers' characteristics and prior conditions were explored.

Data Analysis

Changes in farmers' knowledge and awareness as a result of the intervention were analyzed by Wilcoxon Sign Ranks or paired t-tests. Independent samples t-tests were utilized to assess the differences in knowledge and awareness scores among farmers with dissimilar characteristics and prior conditions. The level of significance was set at 0.05.

Results

The Participants

Thirty-two farmers consented to participate in this study. The majority of them were female (23, 71.9%). More than half (21, 65.6%) had some primary school education. The rest (11, 34.4%) had at least some of secondary school background. The average age of the participants was 44.3 ± 12.9 years old (range 23-70).

Impact of the Intervention on Knowledge and Awareness

At pre-intervention, the majority of participants (60-75%) accurately answered questions 1, 2, and 6, whereas approximately 30-40% had already comprehended questions 3, 4, and 5. Very few were able to answer questions 7, 8, 9, and 10,

which were specific knowledge regarding PGPR technique. Immediately after the intervention, every question in the test was correctly identified by more than 75% of the farmers, except for questions 3 and 4, which were related to general knowledge about pathogens and biological control where approximately half of the farmers obtained correct answers. However, this was significantly higher compared to pre-intervention (50.0 versus 31.3% for question 3, and 53.1 versus 34.4% for question 4).

Correspondingly, total knowledge scores increased significantly ($P<0.001$) after the intervention. This level of knowledge appeared to persist at follow-ups (Table 1).

Before the intervention, the majority of participants exhibited positive feelings about the use of pesticides (Table 2). For example, 34% agreed that "In general, pesticides do not harm the farmers who apply them." Even though most of the farmers (97%) believed that the residue of pesticides could

Table 1 Participants' knowledge of PGPR as a biological control measure at pre-intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-months follow-ups.

Question	Number (percent) correctly answered				
	Pre-intervention (n=32)	Immediately after intervention (n=32)	One-month follow up (n=14)	Three-month follow up (n=10)	Six-month follow up (n=12)
1.	20 (62.5)	27 (84.4) ^a	9 (64.3)	1 (10.0) ^c	10 (83.3)
2.	23 (71.9)	24 (75.0)	13 (92.9)	9 (90.0)	11 (91.7)
3.	10 (31.3)	16 (50.0) ^a	6 (42.9)	4 (40.0)	5 (41.7)
4.	11 (34.4)	17 (53.1) ^a	2 (14.3) ^c	3 (30.0)	4 (33.3)
5.	13 (40.6)	26 (81.3) ^{**a}	10 (71.4)	5 (50.0)	12 (100.0) ^{*c}
6.	24 (75.0)	28 (87.5)	12 (85.7)	7 (70.0)	10 (83.3)
7.	1 (3.1)	27 (84.4) ^{**a}	11 (78.6)	7 (70.0)	10 (83.3)
8.	5 (15.6)	27 (84.4) ^{**a}	13 (92.9)	9 (90.0)	11 (91.7)
9.	5 (15.6)	25 (78.1) ^{**a}	11 (78.6)	9 (90.0)	9 (75.0)
10.	4 (12.5)	30 (93.8) ^{**a}	14 (100.0)	9 (90.0)	10 (83.3)
Total score $\pm$ SD	3.63 $\pm$ 1.98	7.72 $\pm$ 1.84 ^{**b}	7.21 $\pm$ 1.80	6.22 $\pm$ 2.28	7.67 $\pm$ 2.39

Note. Question 1. When is the appropriate time for safely harvesting agricultural produce after chemical application?; 2. Can some fungi, bacteria, and virus in the environment be the cause of diseases in plants?; 3. Can plants be induced against diseases?; 4. What is "biological control?"; 5. Can some fungi, bacteria, and virus in the environment be beneficial to the plants?; 6. Is there any measure besides chemical application to control plant diseases?; 7. What is "PGPR?"; 8. What is the benefit of PGPR to the plants?; 9. What is not the benefit of PGPR to the plants?; and 10. How should PGPR be applied to the plants?

^aWilcoxon Signed Ranks Test, compared with pre-intervention. ^bPaired Samples t Test, compared with pre-intervention. ^cWilcoxon Signed Ranks Test, compared with immediately after intervention.

* $P<0.05$ ** $P<0.001$

Table 2 Participants' awareness of PGPR as a biological control measure at pre-intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-months follow-ups.

Statement	Number (percent) agreed or strongly agreed				
	Pre-intervention (n=32)	Immediately after intervention (n=32)	One-month follow up (n=14)	Three-month follow up (n=10)	Six-month follow up (n=12)
1.	11 (34.4)	7 (21.9)	3 (21.4)	8 (80.0)	4 (33.3)
2.	27 (84.4)	25 (78.1)	12 (85.7)	8 (80.0)	12 (100.0)
3.	31 (96.9)	28 (87.6)	12 (85.7)	10 (100.0)	12 (100.0)
4.	14 (43.7)	16 (50.0)	7 (50.0)	5 (50.0)	7 (58.3)
5.	19 (59.4)	20 (62.6)	9 (64.3)	6 (60.0)	8 (66.7)
6.	8 (25.0)	8 (25.1)	6 (42.9)	7 (70.0)	5 (41.7)
7.	16 (50.0)	6 (18.7) ^a	6 (42.9)	4 (40.0)	6 (50.0)
8.	24 (75.0)	21 (65.7)	9 (64.3)	4 (40.0)	8 (66.7)
9.	11 (34.4)	8 (25.0)	6 (42.9)	3 (30.0)	1 (16.7)
10.	22 (68.8)	16 (50.0)	10 (71.4)	5 (50.0)	6 (50.0)

Note. Statement 1. In general, pesticides do not harm the farmers who apply them.; 2. There should be some other alternatives to pesticides.; 3. Pesticides can be resided in the soil and environment after application.; 4. Pesticides are highly reliable in controlling pest.; 5. Pesticides are cost-effective.; 6. Pesticide-contaminated vegetables can be consumed without any harm.; 7. Pesticide residues can be degraded rapidly in the environment.; 8. Currently, farmers already have a good measure for plant diseases control.; 9. Any alternative method does not affect the current use of pesticides.; and 10. In general, farmers appreciate their use of pesticides for plant diseases control more than any other measures.

^aWilcoxon Signed Ranks Test, compared with pre-intervention

* P<0.01

reside in the environment, half (50%) believed that the environment would be able to cleanse itself rapidly. One-fourth of the farmers understood that the consumers would be safe ingesting these produces, and about half (44%) believed that pesticides were highly reliable. More than half of the farmers were convinced that their current pest-control methods were trustworthy (75%), and the use of pesticides was cost-effective (60%). Positively for the aforementioned reasons, only a few (34%) agreed with the idea of replacing their current methods with an alternative.

The intervention could not significantly alter their awareness, except for the item 7, "Pesticide residues can be degraded rapidly in the environment." That is, significantly fewer farmers agreed with this statement (18.7% at post-intervention versus 50% at pre-intervention, P<0.05). Approximately the same levels of awareness continued to at least six months

Awareness items were then grouped into three domains, namely (1) awareness of pesticide harm, (2) awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use, and (3) awareness of alternatives to pesticide use (Table 3).

Table 3 Domains of awareness among participants at pre-intervention, immediately after intervention, and one-, three-, and six-months follow-ups^a.

Domain (item number)	Mean $\pm$ SD score				
	Pre- intervention (n=32)	Immediately after intervention (n=32)	One-month follow up (n=14)	Three-month follow up (n=10)	Six-month follow up (n=12)
1. Awareness of pesticide harm (1, 3r ^d , 6, 7)	11.93 $\pm$ 1.94	12.07 $\pm$ 1.87 ^a b	11.43 $\pm$ 2.28	11.20 $\pm$ 2.90	11.42 $\pm$ 1.78
2. Awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use (4, 5)	4.87 $\pm$ 1.41	4.48 $\pm$ 1.40	4.79 $\pm$ 1.81	4.30 $\pm$ 1.70	2.50 $\pm$ 0.67 ^{**} c
3. Awareness of alternatives to pesticide use (2r ^d , 8, 9, 10)	10.00 $\pm$ 1.70	10.45 $\pm$ 1.99	10.08 $\pm$ 2.47	13.20 $\pm$ 3.94	11.08 $\pm$ 1.44

Note. ^aHigher scores indicated greater awareness, ^bPaired Samples t Test, compared with pre-intervention. ^cPaired Samples t Test, compared with immediately after intervention. ^dReverted scale.

* P<0.05 **P <0.005

Higher scores indicated greater awareness. Before the intervention, the participants showed moderate awareness levels in all domains, meaning that they are indifferent of pesticide use. Immediately after the intervention, awareness of pesticide harm increased significantly (P<0.05). However, their awareness of the ineffectiveness to costs of and alternatives to pesticides remained the same after intervention. At one-, three- and six-month follow-ups, the same levels of awareness in all domains were reported. Interestingly, however, the farmers exhibited significantly lower awareness of ineffectiveness to costs of pesticides at six-month follow-up compared with post-intervention.

This drastic drop of awareness had not been evident at all in one- or three-month follow-up visits.

Factors Affecting Knowledge and Awareness

Four prior conditions were hypothesized to affect the level of knowledge and awareness among farmers, i.e., age (under/over 40), gender (male/female), educational level (some primary/some secondary school), and frequency of chemical use (frequent/non-frequent users). To test these hypotheses, baseline knowledge and awareness scores of participants of different conditions were compared (Table 4).

Table 4 Basic knowledge and awareness among participants of different age, gender, educational level and frequency of pesticide use.

Hypothesized variable (valid n)	Mean $\pm$ SD score			
	Prior knowledge	Prior awareness of pesticide harm	Prior awareness of ineffectiveness to costs of pesticide use	Prior awareness of alternatives to pesticide use
Age:				
≤ 40 (n=11)	4.36 $\pm$ 1.80	10.00 $\pm$ 1.73	5.27 $\pm$ 1.56	11.09 $\pm$ 1.58
> 40 (n=20)	3.05 $\pm$ 1.85	9.75 $\pm$ 1.71	4.70 $\pm$ 1.34	9.40 $\pm$ 1.54** a
Gender:				
Male (n=9)	3.55 $\pm$ 1.94	8.89 $\pm$ 1.45	4.55 $\pm$ 1.59	9.89 $\pm$ 1.83
Female (n=23)	3.65 $\pm$ 2.03	10.17 $\pm$ 1.64* a	5.00 $\pm$ 1.35	10.04 $\pm$ 1.69
Education:				
Primary school (n=21)	3.05 $\pm$ 1.86	9.38 $\pm$ 1.75	4.77 $\pm$ 1.44	9.57 $\pm$ 1.69
Secondary school (n=11)	4.73 $\pm$ 1.80* a	10.64 $\pm$ 1.21* a	5.09 $\pm$ 1.38	10.82 $\pm$ 1.47* a
Frequency of pesticide use:				
Frequent user (n=17)	3.41 $\pm$ 1.97	9.88 $\pm$ 1.61	4.71 $\pm$ 1.49	10.24 $\pm$ 1.82
Non-frequent user (n=11)	4.00 $\pm$ 2.28	9.27 $\pm$ 1.49	4.82 $\pm$ 1.33	9.73 $\pm$ 1.62

Note. ^aIndependent samples t test.

* P<0.05 **P <0.001

Education: Educational level was a very important factor to distinguish prior knowledge and awareness levels among farmers. Farmers who received at least some secondary school education exhibited significantly greater knowledge and awareness of pesticide safety and alternatives to pesticide use than those with primary school education (P<0.05).

Age: At pre-intervention, awareness of alternative to pesticide use notably differed among farmers of dissimilar age groups (P<0.005). Younger farmers were more aware of other options than their older counterparts.

Gender: With regard to gender, female farmers demonstrated considerably higher level of awareness about harms of pesticides than males (P<0.05).

Frequency of Pesticide Use: Frequent users were defined as those who reported applying pesticides at least once a week. In this study, we found no statistical difference between knowledge and awareness among frequent and non-frequent users.

Discussion and Conclusion

Before discussing the results of this study, few limitations need to be addressed. First, the study was conducted on one location, i.e., Phitsanulok. The result may not be generalizable to farmers of different locations. Second, due to the participatory nature of this study, only a group of interested farmers volunteered to partake in our one-day, lecture-based intervention. This small number of participants was the main disadvantage of this study. In addition, loss to follow-up contributed to even smaller number of participants. Statistical analysis results must be interpreted with caution.

The inability of our intervention to shift participants' awareness was hypothesized to be due to the fact that knowledge is only one among many factors affecting the formation of awareness. As Ajzen (1988) mentioned, awareness or attitudes consist of the cognitive, affective and conative elements. The cognitive component of attitudes is formed by knowledge, direct experience and related information about the object. The affective component is shaped by the person's assessment (emotions or feeling) toward the object. Finally, the conative component is shaped by the individual's absolute and relative intention to practice. In this study, our intervention focused solely on providing information, hence targeting the cognitive part. The other elements need to be taken into consideration to achieve awareness formation. Previous studies had

shown that hands-on experience and participatory activities were effective in changing farmers' perception and awareness (Wadsworth, 1990; Bacic *et al.*, 2006). Likewise, regular visits by change agents were proved to be effective in changing farmers' awareness and intention to adopt new technologies (Williamson *et al.*, 1988; Schuck *et al.*, 2002). Only when awareness is formed, one can move to the next stage of adoption process, i.e., persuasion.

Farmers with more years in school were more knowledgeable of PGPR as a biological control measure than those with less schooling. We also found that female farmers were more concerned about pesticide safety than male farmers. Additionally, younger farmers were more aware of alternatives to pesticides than older ones. Our findings were consistent with previous studies (Black and Reeve, 1993; Morris *et al.*, 2000; Reece and Sumberg, 2003). In addition, these results confirm the presupposition of Diffusion of Innovations Theory that prior conditions play an important role in the process of adoption (Rogers, 1983; Adesina and Zinnah, 1993; Adesina and Baidu-Forson, 1995). However, we did not find at pre-intervention any statistical difference between knowledge and awareness levels among farmers of different frequencies of pesticide use. This finding may indicate that some factors besides knowledge and awareness were critical in distinguishing farmers' pesticide use behavior. Exit interviews with 32 participating farmers on the intervention day revealed that, serious plant disease epidemic during that particular season was the main justification for them to use pesticide aggressively. We hypothesized, then, that lack of effective alternatives was the main factor in determining the use of pesticides among these farmers.

The last issue concerns the applicability of the theory itself. Since Diffusion of Innovations Theory was created in western culture environment (Rogers, 1983), there is a possibility that the theory may not be appropriately applied in Thai culture. Future studies should also address the issue about cultural implications and applications of the theory.

In conclusion, this study was the first of its kind to examine the results of a one-day, lecture based intervention on farmers' knowledge and awareness of PGPR as a biological control measure in the Thai context. The intervention exhibited a significantly positive impact on Phitsanulok farmers' knowledge of PGPR as a biological control measure. This change was robust, and persisted at least six months. However, the intervention was not enough to increase farmers' awareness of the issues, except a minor improvement in awareness of pesticide harm. Future studies concerning on awareness rising is highly warranted to move farmers along the adoption process.

Acknowledgements

We are grateful to the industrious help of Amornlak Preechaharn, Chuanchom Thananithisak Duanghathai Janchua, Nantawarn Kittikannakorn, Naruemon Bumrungsawad, Ratree Manthaisong, and Supachai Jirakoup in data collection process. Sincere appreciation goes to our financial support agencies: the Thailand Research Fund (grant no. RSA4680006), and Naresuan University.

References

- Adesina, A. A. and M. M. Zinnah. 1993. Technology characteristics, farmers' perceptions and adoption decisions: A Tobit model application in Sierra Leone. *Agr. Econ.* 9(4): 297-311.
- Adesina, A. A. and J. Baidu-Forson. 1995. Farmers' perception and adoption of new agricultural technology: Evidence from analysis in Burkina Faso and Guinea, West Africa. *Agr. Econ.* 13(1): 1-9.
- Ajzen, I. 1988. *Attitudes, Personality, and Behavior*. Dorsey Press, Chicago. 278 pp.
- Bacic, I. L. Z., D. G. Rossiter and A. K. Bregt. 2006. Using spatial information to improve collective understanding of shared environmental problems at watershed level. *Landsc. Urban. Plan.* 77(1-2): 54-66.
- Black, A. W. and I. Reeve. 1993. Participation in landcare groups: The relative importance of attitudinal and situational factors. *J. Environ. Manage.* 39(1): 51-71.
- Glick, B. R., C. B. Jacobson, M. M. K. Schwarze and J. J. Pasternak. 1994. Does the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase play a role in plant growth-promotion by *Pseudomonas putida* GR12-2?. pp. 150-152. In: M. H. Ryder, P. M. Stephens and G. D. Bowen (eds.), *Improving plant productivity with rhizosphere bacteria*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaide, Australia.
- Jetiyanon, K. and J. W. Kloepper. 2002. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control.* 24(3): 285-291.
- Jetiyanon, K., W. D. Fowler and J. W. Kloepper. 2003. Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under

- field conditions in Thailand. *Plant Dis.* 87(11): 1390-1394.
- Kanato, M. 1998. Health risk associated with hazardous pesticide use among Thai agriculture workers in 30 rural communities. *J. Clin. Epidemiol.* 51(Suppl.1): 23S.
- Kloepper, J. W., F. M. Scher, M. Laliberte and B. Tipping. 1986. Emergence-promoting rhizobacteria: Description and implications for agriculture. pp. 155-164. *In*: T. R. Swinburne (ed.). Iron, Siderophore, and Plant Disease. Plenum, New York.
- Lapar, M., A. Lucila and S. Pandey. 1999. Adoption of soil conservation: The case of the Philippine uplands. *Agr. Econ.* 21(3): 241-256.
- Office of Agricultural Economics. 2005. Economics and agricultural data (imported pesticides). (Online). Available: <http://www.oae.go.th/statistic/import/imPTC.xls> (June 6, 2005).
- Food and Drug Administration. 2004. Health risk assessment of agricultural workers using chemical pesticides. Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand. 150 pp.
- Morris, J., J. Mills and I. M. Crawford. 2000. Promoting farmer uptake of agri-environment schemes: The countryside stewardship arable options scheme. *Land Use Policy* 17(3): 241-254.
- Raupach, G. S., L. Liu, J. F. Murphy, S. Tuzun and J. W. Kloepper. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis.* 80(9): 891-894.
- Reece, J. D. and J. Sumberg. 2003. More clients, less resources: toward a new conceptual framework for agricultural research in marginal areas. *Technovation* 23(5): 409-421.
- Rogers, E. M. 1983. *Diffusion of Innovations*. (3rd ed.). Collier Macmillan, London. 519 pp.
- Schuck, E. C., W. Nganje and D. Yantio. 2002. The role of land tenure and extension education in the adoption of slash and burn agriculture. *Ecol. Econ.* 43(1): 61-70.
- van Peer, R., G. J. Niemann and B. Schippers. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Wadsworth, J. 1990. Developing efficient extension strategies: Results of an experiment involving Costa Rican livestock producers. *Agr. Syst.* 34(3): 259-275.
- Wei, G., J. W. Kloepper and S. Tuzun. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81: 1508-1512.
- Williamson, N. B., M. J. Burton, W. B. Brown, L. E. Baumann and R. J. Farnsworth. 1988. Changes in mastitis management practices associated with client education, and the effects of adoption of recommended mastitis control procedures on herd milk production. *Prev. Vet. Med.* 5(3): 213-223.
- Zhang, S., W. Xu, Z. Yan and R. Mei. 1996. Research and commercialization of yield-increasing bacteria in China, pp. 47-53. *In*: W. H. Tang, R. J. Cook and A. D. Rovira (eds.). *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. China Agricultural University Press, Beijing, China.

การจำแนกยีนที่ต้านทานต่อเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็น สาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านมโดยใช้ เทคนิค DDRT-PCR

Identification of Resistant Gene Against *Escherichia coli* Causing Diarrhea in Pre-weaned Pigs Using DDRT-PCR Technique

จิรพิพรรธ แพรไพศาล^{1/}ศุภมิตร เมฆฉาย^{1/} และ พัชรินทร์ ครุฑเมือง^{2/}
Chirapiphat Phraephaisarn,^{1/} Supamit Mekchay¹ and Pacharin Krutmuang^{2/}

Abstract: Diarrhea due to *Escherichia coli* (*E. coli*) infection is an important problem in pig production especially in pre-weaned period. It is responsible for considerable high economic losses. The *E. coli* susceptible or resistant pigs were presented or absent specific receptor on brush border of small intestine and associated with adhesion or non adhesion of bacteria to the receptors, respectively. In this study, brush border adhesion test was used to classify susceptible and resistant phenotype of piglets. Differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) was performed with 12 combination primers (dT₁₂VG anchored and arbitrary primers) to identify differentially expressed genes in brush border between two phenotypic groups. The results showed that adhesion values of the susceptible and resistant piglet group were 32% and 7%, respectively. The results of DDRT-PCR analysis showed a total of 512 cDNA fragments and had band size from 150 to 570 bp. Average cDNA fragment were 42.67 cDNA bands per a primer combination. Twelve specific bands revealed differential expression between two piglet groups. Out of these, 7 bands were only expressed in susceptible phenotype where as 5 bands were only expressed in the resistant piglet group. Five cDNA fragments were successfully cloned and sequenced. Three clones (ZP18B3, ZP24B2 and ZP18B1) showed homology with Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPP1*), S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) and liver

^{1/}ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/}ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

^{2/} Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200.

porcine EST (AK232914), respectively. Two clones (ZP01B1 and ZP17B1) did not show any homology and were identified as novel gene. These ESTs could be used as candidate genes for further investigating of the resistant and susceptible to diarrhea in pre-weaned pigs.

Keywords: Brush bor, ahea, DDRT-PCR, *E. coli* K88, pre-weaned pigs

บทคัดย่อ: โรคท้องร่วงที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Escherichia coli* (*E. coli*) เป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในระยะก่อนหย่านม ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในระดับสูง โดยลักษณะความอ่อนแอ หรือความต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* ในสุกรนั้น เกิดจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏตัวรับ (receptor) บน brush border ของผนังลำไส้เล็กของลูกสุกร ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการยึดเกาะได้หรือไม่ของเชื้อ *E. coli* ในการศึกษาครั้งนี้ลักษณะความต้านทานและความอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม ถูกจำแนกโดยวิธี adhesion test และเทคนิค Differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) ถูกนำมาใช้ในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรทั้งสองกลุ่ม โดยใช้ชุดไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ (dT₁₂VG anchored และ arbitrary primers) ผลการทดสอบ adhesion test พบว่าสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border เท่ากับ 32% ในขณะที่สุกรที่มีลักษณะต้านทาน มีค่าเท่ากับ 7 % (P<0.05) ผลจากการคัดกรองเครื่องหมายโมเลกุล cDNA-DDRT-PCR ด้วยไพรเมอร์ดังกล่าว สามารถเพิ่มจำนวนแถบ cDNA ที่มีขนาดในช่วง 150-570 bp เป็นจำนวน 512 แถบ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.67 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ นอกจากนี้แถบ cDNA ที่ปรากฏแตกต่างกัน (differential cDNA fragment) ระหว่างสุกรทั้งสองกลุ่ม มีจำนวน 12 แถบ โดยปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่มีลักษณะต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 จำนวน 5 และ 7 แถบ ตามลำดับ เครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR ดังกล่าว ถูกโคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีเพียง 5 โคลนที่ประสบความสำเร็จ โดย 3 โคลน (ZP18B3, ZP24B2 และ ZP18B1) พบว่าเหมือน (homology) กับยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPP1*) ยีน S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) และ EST ที่มีการแสดงออกในตับของสุกร (AK232914) ตามลำดับ ส่วนอีก 2 โคลน (ZP01B1 และ ZP17B1) พบว่าเป็นยีนใหม่ ซึ่งไม่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งยีนเหล่านี้จะถูกใช้เป็น candidate gene สำหรับศึกษาลักษณะความต้านทาน หรือความอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงในลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมต่อไป

คำสำคัญ: โรคท้องร่วง ลูกสุกรก่อนหย่านม Brush border, DDRT-PCR, *E. coli* K88

คำนำ

โรคท้องร่วงในลูกสุกรระยะก่อนหย่านมเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมผลิตสุกร โดยทำให้ลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมตายสูงถึง 2.7 เปอร์เซ็นต์ (Python et al., 2002) ซึ่งมีเชื้อสาเหตุ คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) ที่มี antigen เป็น K88-fimbriae ซึ่งสามารถยึดเกาะกับตัวรับ (receptors) ที่อยู่บน brush border ของผนังลำไส้เล็กของสุกรได้อย่างจำเพาะเจาะจง (Van den Broeck et al., 2000) เชื้อดังกล่าว สามารถสร้างโคโลนี และผลิตสารพิษไปกระตุ้น

การขับน้ำและอิเล็กโทรไลต์ออกสู่ช่องว่างของลำไส้เล็กจำนวนมาก ทำให้ลูกสุกรเกิดอาการท้องร่วงตามมา สำหรับความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* K88 กับผนังลำไส้ขึ้นอยู่กับความผันแปรทางพันธุกรรมของสุกร ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ (Francis et al., 1998) ลักษณะนี้ควบคุมด้วยยีนที่อยู่บนโครโมโซม (Hu et al., 1993) ซึ่งภายหลังถูกระบุว่าตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 13 ของสุกร (Python et al., 2002) แต่ในปัจจุบันนี้ ยังไม่สามารถระบุชี้ชัดได้ว่ายีนใดเป็นสาเหตุที่แท้จริงของความผันแปรลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรได้ อย่างไรก็ตาม ตัวรับ (receptor) ของเชื้อ

E. coli K88 บน brush border ที่ผนังลำไส้ของลูกสุกรยังเป็นปัญหาสำคัญในประเด็นดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงต้องการจำแนกความแตกต่างของยีนที่แสดงออกใน brush border ของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมที่มีฟิโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ในเบื้องต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้ ลูกสุกรในระยะก่อนหย่านมที่อายุ 14 วัน 2 สายพันธุ์ คือ พันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์ทางการค้า (Large White X Landrace) จำนวน 6 ตัว (พันธุ์ละ 3 ตัว) ลูกสุกรพันธุ์พื้นเมืองได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่ สำหรับลูกสุกร สายพันธุ์ทางการค้า ได้รับความอนุเคราะห์จากฟาร์มสุกรภาควิทยาศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สุกรทั้งหมดถูกเก็บลำไส้เล็กในส่วนเจจูนัม (jejunum) มาแช่น้ำแข็ง เพื่อใช้ทดสอบการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border และเนื้อเยื่อของลำไส้ อีกส่วนหนึ่งถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อสกัด RNA ต่อไป

การจำแนกฟิโนไทป์ในสุกร

การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border บนผนังลำไส้ของลูกสุกรนั้นถูกทดสอบโดยวิธี Brush border adhesion test ตามวิธีการของ Python (2003) เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ O157 ซึ่งมีการแสดงออกของ K88 fimbriae ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข เซลล์ brush border จากลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม ถูกผสมเข้ากับเซลล์ *E. coli* และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวไปตรวจนับการยึดเกาะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) โดยเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับ brush border พิจารณาจากการสุ่มนับ brush border จำนวน 40 เซลล์ และคำนวณดังสูตร

เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ =

$$\frac{\text{จำนวน brush border ที่ถูกยึดเกาะโดย } E. coli \text{ ตั้งแต่ 2 เซลล์ขึ้นไป}}{\text{brush border จำนวน 40 เซลล์}} \times 100$$

ถ้าจำนวน brush border ถูกยึดเกาะด้วยเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่สองเซลล์ขึ้นไป มีมากกว่า 10 % จัดว่ามีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* แต่ถ้า brush border ถูกยึดเกาะด้วยเชื้อ *E. coli* ตั้งแต่สองเซลล์ขึ้นไป มีจำนวนน้อยกว่า 10 % จัดว่าสุกรมีความต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* (Python, 2003)

การวิเคราะห์ DDRT-PCR

ตัวอย่าง RNA ของเซลล์ brush border จากผนังลำไส้เล็ก ถูกสกัดโดยใช้ Trizol reagent (Invitrogen) และจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนออกด้วย DNase I (Promega) ก่อนแยก RNA ให้บริสุทธิ์ด้วย RNeasy mini Kit (Qiagen) ตัวอย่าง RNA สุกร ถูกนำไปวิเคราะห์ห้ายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border ระหว่างกลุ่มที่มีฟิโนไทป์ต้านทาน และอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* โดยใช้เทคนิค DDRT-PCR ตามวิธีการของ Bauer *et al.* (1993) ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้ ขั้นตอนแรกสังเคราะห์ first strand cDNA จากตัวอย่าง RNA ซึ่งประกอบด้วย RNA จำนวน 1 µg, oligo dT₁₂VG จำนวน 100 pmol ในปริมาตร 12 µl นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 นาที จากนั้นเติมส่วนผสมของเอนไซม์ Superscript-III reverse transcriptase จำนวน 8 µl ซึ่งประกอบไปด้วย : dNTPs จำนวน 10 µM, DTT จำนวน 10 mM เอนไซม์ RNase Inhibitor (Promega) จำนวน 10 units และเอนไซม์ Superscript-III reverse transcriptase (Invitrogen) จำนวน 200 units ในสารละลาย 1X first strand buffer (Invitrogen) นำส่วนผสมทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 15 นาที และเจือจางสารละลาย first strand cDNA ด้วย RNase free water ในอัตราส่วน 1 : 5 ตัวอย่าง cDNA ถูกคัดกรองหาเครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน

Table 1 Nucleotide sequence of DDRT-PCR primer.

Primer	Nucleotide sequences		Nucleotide sequences	
ZP1	Forward	5'-TACAACGAGG-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP2	Forward	5'-CTTTCTACCC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP3	Forward	5'-TTTTGGCTCC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP4	Forward	5'-GGAACCAATC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP5	Forward	5'-AAACTCCGTC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP6	Forward	5'-TCGATAAGGG-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP13	Forward	5'-GTTTTCGCAG-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP15	Forward	5'-GATCCAGTAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP16	Forward	5'-GATCACGTAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP17	Forward	5'-GATCTGACAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP18	Forward	5'-GATCTCAGAC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'
ZP24	Forward	5'-GATCTAGGTC-3'	Reverse	5'-TTTTTTTTTTTTTVG-3'

12 คู่ (ตารางที่ 1) ปฏิกริยา PCR ถูกเตรียมในปริมาตร 20 μ l ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้ cDNA แม่แบบ จำนวน 2.0 μ l, dNTPs 200 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, oligo dT primer 1 μ M, arbitrary decamer primer (ตารางที่ 1) 0.2 μ M และ เอนไซม์ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) จำนวน 1 unit ปฏิกริยา PCR ถูกควบคุมที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที และตามด้วยที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที/อุณหภูมิ 42 °C นาน 1 นาที/อุณหภูมิ 72 °C นาน 1 นาที โดยทำซ้ำจำนวน 50 รอบ และสุดท้ายบ่มปฏิกริยา PCR ไว้ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที หลังจากนั้นเติม loading buffer (formamide 95%, NaOH 10 mM, bromophenol blue 0.25% และ xylene cyanol) จำนวน 6 μ l ลงใน ผลผลิต PCR ก่อนนำไปแยกขนาดชิ้นส่วน DNA บน denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (6%) โดยใช้กำลังไฟ 50 W เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และนำแผ่นเจล ไปย้อมด้วย silver staining และอบแผ่นเจลให้แห้งด้วย เครื่อง gel dryer (Amersham Bioscience) cDNA จำเพาะ เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมสำหรับโคลนเข้าสู่ pGEM[®]-T easy vector (Promega) แล้วนำไปวิเคราะห์ ลำดับพันธุกรรม

การเพิ่มปริมาณแถบ DDRT-PCR และวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์

แถบ DDRT-PCR ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่าง สุกอร์ที่มีฟิโนไทป์ด้านทาน หรืออ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ถูก ตัดจากแผ่นเจล และนำไปต้มในสารละลาย 2 x PCR buffer ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที และบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 4 °C ชั่วครู่ เพื่อแยกแถบ DNA ออกจากเจล สารละลายแถบ DNA ที่ได้ ถูกใช้เป็นแม่แบบ สำหรับเพิ่ม ปริมาณ DNA ด้วยปฏิกริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่เดิม ที่ ตรวจพบความแตกต่างของแถบ DNA ในขั้นตอนการ วิเคราะห์ DDRT-PCR ผลผลิต PCR ที่ได้ถูกโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy vector (Promega) และวิเคราะห์ลำดับ พันธุกรรม (Nucleotide sequencing) ด้วยเครื่อง Automated Sequence CEQ8000 Genetic analysis system (Beckman-Coulter) ข้อมูลลำดับพันธุกรรมที่ได้ ถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank ด้วย โปรแกรม BLAST (Altschul *et al.*, 1997) โดยพิจารณา ความคล้ายคลึง (identity) จากค่า E-value ซึ่งต้องมีค่า น้อยกว่า 1e-10 และ/หรือมี overlapping region มากกว่า 100 bp ที่มีค่า identity มากกว่า 80% จึงจะถือว่ามีความ คล้ายคลึงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลอง

การจำแนกยีนในไทป์ที่ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรก่อนหย่านม

ผลการทดสอบ adhesion test ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม (ภาพที่ 1) พบว่าเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* กับตัวรับของ brush border มีค่าอยู่ระหว่าง 4-41 % และเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอ หรือต้านทาน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ มีค่าเฉลี่ยประมาณ 32 % (25-40%) ซึ่งพบในสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ในขณะที่ลูกสุกรที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* มีค่าเฉลี่ยประมาณ 7 % (4-9%) ซึ่งพบในสุกรพันธุ์พื้นเมือง ดังภาพที่ 2

การจำแนกยีนโดยเทคนิค DDRT-PCR

ผลการวิเคราะห์ยีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ด้วยเทคนิค DDRT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 คู่ พบแถบ cDNA ที่มีขนาดในช่วง 150-570 bp จำนวนทั้งหมด 512 แถบ โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ สามารถผลิตแถบ cDNA ได้ตั้งแต่ 21-84 แถบ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 42.67 แถบ/ไพรเมอร์ ในการศึกษาครั้งนี้เทคนิค DDRT-PCR สามารถตรวจพบแถบ cDNA ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างกลุ่มของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 (non-shared band หรือ specific band) จำนวน 12 แถบ (ภาพที่ 3) โดยเครื่องมือ DDRT-PCR จำนวน 5 แถบ ปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่ต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* K88 ซึ่งได้จากคู่ไพรเมอร์ dT₁₂VG-ZP6, dT₁₂VG-ZP13 และ dT₁₂VG-ZP18 จำนวน 1 แถบ (340 bp), 1 แถบ (460 bp) และ 3 แถบ (296, 230 และ 220 bp) ตามลำดับ สำหรับเครื่องมือ DDRT-PCR ที่ปรากฏเฉพาะในกลุ่มของลูกสุกรที่อ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 มีจำนวน 7 แถบ โดยพบจากคู่ไพรเมอร์ dT₁₂VG-ZP1, dT₁₂VG-ZP17, dT₁₂VG-ZP18 และ dT₁₂VG-ZP24 จำนวน 1 แถบ (194 bp), 1 แถบ (188 bp), 3 แถบ (530, 297 และ 262 bp) และ 2 แถบ (350 และ 309 bp) ตามลำดับ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA-DDRT-PCR

เครื่องหมายโมเลกุล cDNA-DDRT-PCR ที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานหรืออ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 จำนวน 12 แถบ ถูกโคลนเข้าสู่ vector และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 5 (42 %) แถบ ที่ประสบความสำเร็จในการโคลน คือ ZP01B1, ZP17B1, ZP18B1, ZP18B3 และ ZP24B2 จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA ทั้ง 5 โคลน พบว่าความยาวของแถบ cDNA อยู่ระหว่าง 162-283 bp โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบ cDNA (Expressed Sequence Tags, EST) ทั้งหมดปรากฏไพรเมอร์ทั้ง anchor และ arbitrary primer และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ EST เหล่านี้กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า EST จำนวน 3 โคลน (ZP18B1, ZP18B3, ZP24B2) เหมือนกับยีนในฐานข้อมูล โดยโคลน ZP18B3 เหมือนกับ ยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (DPP1) ของไก่ (GenBank accession no. XM_417207) 99 % (identity) ซึ่งมีค่า E-value เท่ากับ 9e-121 ในขณะที่โคลน ZP24B2 คล้ายกับยีน S-adenosylhomocysteine hydrolase ของสุกร (AJ427478) 87 % (identity) และมีค่า E-value เท่ากับ 2e-14 สำหรับ EST-ZP18B1 คล้ายกับ EST ที่แสดงออกในตับของสุกร (AK232914) 98 % (identity) โดยมีค่า E-value เท่ากับ 2e-140 ส่วน ESTs จำนวน 2 โคลน (ZP01B1 และ ZP17B1) นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับยีน หรือ EST ใดในฐานข้อมูลของ GenBank (ตารางที่ 2) โดย EST ทั้ง 5 โคลน ดังกล่าวนั้น พบเฉพาะในกลุ่มของลูกสุกรที่มีไทป์ต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* K88

วิจารณ์

โรคท้องร่วงที่เกิดจากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม นับว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างมากและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกร จากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อโรคตามมา สำหรับแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้อย่าง

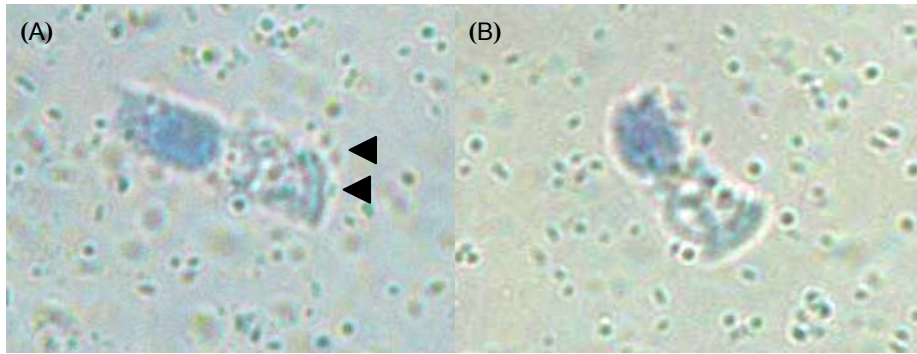


Figure 1 Adhesion of K88-*E. coli* to receptors on brush border (x40).

(A) Adhesion of *E. coli* K88 to the receptor. Arrows indicate adhered *E. coli* cell.

(B) No adhesion between K88-*E. coli* and the receptor.

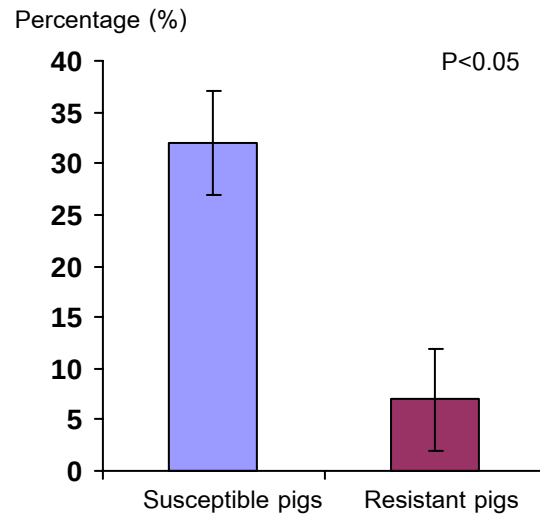


Figure 2 Percentage of adhesion of K88-*E. coli* to brush border on porcine small intestine.

ยั้งยีน คือ การใช้องค์ความรู้ทางอณูพันธุศาสตร์เข้ามาช่วยในการคัดเลือกสุกรที่ต้านทานต่อโรคท้องร่วง ดังตัวอย่างที่ประสบความสำเร็จ คือการใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน alpha 1,2 Fucosyltransferase (*FUT1*) เพื่อคัดเลือกลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* F18 ที่เป็นสาเหตุของโรคท้องร่วงของลูกสุกรในระยะหลังหย่านม (Meijerink *et al.*, 2000) แต่สำหรับปัญหาการเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรก่อนหย่านมนั้น มีสาเหตุจากเชื้อ

E. coli K88 โดยการยึดเกาะของเชื้อดังกล่าวกับ ตัวรับ (receptor) บน brush border ของผนังลำไส้เล็กได้หรือไม่ได้นั้น มีความสัมพันธ์กับลักษณะความอ่อนแอ หรือความต้านทานของลูกสุกร (Van den Broeck *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ยังไม่สามารถระบุถึงยีนที่เป็นสาเหตุของลักษณะดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ในการศึกษาครั้งนี้ได้พยายามศึกษาหา ยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์

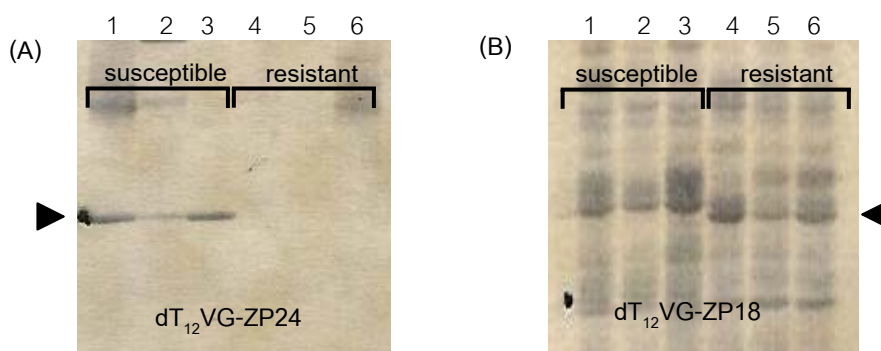


Figure 3 Differential display banding pattern of individual piglets obtained with the primer combination dT₁₂-VG-ZP24 (A) and dT₁₂-VG-ZP18 (B). Arrows indicate the position of differentially expressed cDNA bands of brush border cells from susceptible and resistant pigs.

Table 2 Sequence similarity and characterization of differentially expressed transcripts.

EST*	Length (bp)	Homology (GenBank accession no.)	Species	% similarity (bp)	E-value
ZP24B2	283	Dipeptidyl-peptidase I precursor (DPPI) (XM_417207)	chicken	99% (228/230)	9e-121
ZP18B3	262	S-adenosylhomocysteine hydrolase (AHCY) (AJ27478.2)	Pig	87% (84/96)	2e-14
ZP18B1	273	EST expressed in liver (AK232914)	pig	98% (264/267)	2e-140
ZP17B1	162	No homology	-	-	-
ZP01B1	170	No homology	-	-	-

* EST = expressed sequence tag.

ต้านทาน และอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 จากผลการทดสอบ brush border adhesion พบว่าลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอ มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* (37 %) สูงกว่าลูกสุกรกลุ่มที่ต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* (7 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยลูกสุกรที่มีลักษณะต้านทานต่อเชื้อ *E. coli* K88 พบในสุกรพันธุ์พื้นเมือง ส่วนลูกสุกรที่มีลักษณะอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 พบในสุกรสายพันธุ์ทางการค้า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baker *et al.* (1997) และ Sellwood (1980) ที่รายงานว่า การยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* K88 กับ brush

border ในลูกสุกรสายพันธุ์ทางการค้า มีแนวโน้มสูงกว่ากับลูกสุกรพันธุ์พื้นเมือง

สำหรับการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border จากผนังลำไส้เล็กของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม ที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ด้วยเทคนิค DDRT-PCR ในการศึกษาครั้งนี้ พบเครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR จำนวน 12 เครื่องหมาย แต่ประสบความสำเร็จในการโคลน และวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ จำนวน 5 โคลน ในจำนวนนี้ 3 โคลน (ZP18B3, ZP24B2 และ ZP18B1) มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์เหมือนกับยีน Dipeptidyl-peptidase I precursor (*DPPI*), ยีน S-Adenosylhomocysteine hydrolase (*AHCY*) และ EST ที่แสดงออกในตับของสุกร ตามลำดับ ส่วน EST จำนวน 2 โคลน ที่เหลือนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนกับยีน หรือ EST ใดในฐานข้อมูลของ GenBank สำหรับยีน *DPPI* หรืออีกชื่อหนึ่งเรียกว่า cathepsin C เป็น cysteine protease ในกลุ่มไลโซซิม ที่มีคุณสมบัติในการตัดโมเลกุลของกรดอะมิโนสองตัวทำให้ออกจากโปรตีนหรือสายเปปไทด์ได้ (Hsiung *et al.*, 2005) ซึ่งสันนิษฐานว่า ยีน *DPPI* อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการสร้างโมเลกุลตัวรับบนเซลล์ brush border ที่มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (Francis *et al.*, 1998; Grange *et al.*, 2002) และเหมาะสมต่อการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* K88 ที่ผนังลำไส้เล็กของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม จากการวิเคราะห์แผนที่ยีนเชิงเปรียบเทียบ (comparative gene mapping) ระหว่างคนและสุกร พบว่ายีน *DPPI* ในสุกรอยู่บนโครโมโซมที่ 2 สำหรับยีน *AHCY* ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 17q22 ซึ่งยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ ที่มีอิทธิพลต่อตัวรับของเซลล์ brush border ที่ผนังลำไส้เล็กของสุกรอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม ในคนยีน *AHCY* ควบคุมการผลิตเอนไซม์ S-Adenosylhomocysteine hydrolase ซึ่งมีบทบาทต่อการเปลี่ยน S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) ไปเป็น adenosine (Ado) และ L-homocysteine (Hcy) ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในร่างกาย นอกจากนี้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ S-Adenosylhomocysteine ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation ในสิ่งมีชีวิตอีกด้วย (Hermes *et al.*, 2006) ดังนั้นผลการตรวจพบแถบยีน *AHCY* ซึ่งมีการแสดงออกในเซลล์ brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ที่อ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 แสดงให้เห็นว่ายีนนี้อาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของตัวรับบนเซลล์ brush border ของลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม จากรายงานก่อนหน้านี้ Qi *et al.* (2004) ได้จำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรในระยะก่อนหย่านม ด้วยเทคนิค DDRT-PCR โดยใช้มันเป็นอวัยวะเป้าหมาย ซึ่งพบยีนที่แสดงออกแตกต่าง

กันในสุกรที่อ่อนแอ คือ mammalian Nck adaptor protein 1 และ human LINE-1 reverse transcriptase ปรากฏอยู่ในกลุ่มของลูกสุกรที่อ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* เช่นกัน

เครื่องหมายโมเลกุล cDNA-DDRT-PCR ที่ได้จากการศึกษาหอยีนที่แสดงออกแตกต่างกันในเซลล์ brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทานและอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 ในลูกสุกรระยะก่อนหย่านม นั้น เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีศักยภาพต่อการศึกษายีนที่เป็นสาเหตุที่แท้จริงของโรสดังกล่าว อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของยีนหรือ EST ดังกล่าว จะถูกยืนยันผลด้วยเทคนิค Quantitative real time PCR ต่อไป นอกจากนี้ยังมีวิธีการวิเคราะห์ functional genomics แบบอื่น อาทิเช่น microarray รวมถึงการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (proteomic analysis) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีศักยภาพต่อการค้นหา candidate gene ที่เกี่ยวข้องหรือควบคุมลักษณะความต้านทาน หรืออ่อนแอต่อโรคท้องร่วงในลูกสุกรระยะก่อนหย่านมได้ โดยช่วยให้ทราบข้อมูลของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องหรือควบคุมลักษณะดังกล่าวได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุป

การค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันใน brush border ของลูกสุกรที่มีฟีโนไทป์ต้านทาน และอ่อนแอต่อเชื้อ *E. coli* K88 โดยเทคนิค DDRT-PCR จากการใช้ไพโรเมออร์ จำนวน 12 คู่ สามารถตรวจพบแถบ cDNA จำนวน 12 แถบ ที่ปรากฏแตกต่างกันระหว่างสุกรทั้งสองกลุ่ม ในจำนวนนี้เครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR จำนวน 5 แถบ ประสบความสำเร็จในการโคลน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ โดยเครื่องหมายโมเลกุล DDRT-PCR จำนวน 3 โคลน คือ ZP18B3, ZP24B2 และ ZP18B1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์กับเหมือนกับยีน *DPPI*, *AHCY* และ EST ที่แสดงออกในตับของสุกร ตามลำดับ ส่วน EST จำนวน 2 โคลน ที่เหลือนั้น (ZP01B1 และ ZP17B1) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ไม่เหมือนกับยีน หรือ EST ใดในฐานข้อมูลของ GenBank

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และโครงการสร้างฐาน
ข้อมูลและพัฒนาบุคลากรด้านนาโนเทคโนโลยีทาง
การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang,
Z. Zhang, W. Miller and D.J. Lipman. 1997.
Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new
generation of protein database search
programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Baker, D.R., L.O. Billey and D.H. Francis. 1997.
Distribution of K88 *Escherichia coli*-
adhesive and nonadhesive phenotypes
among pigs of four breeds. *Vet. Microbiol.*
54: 123-132.
- Bauer, D., H. Muller, J. Reich, H. Riedel, V. Ahrenkiel,
P. Warthoe and M. Strauss. 1993.
Identification of differentially expressed
mRNA species by an improved display
technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.*
21: 4272-4280.
- Francis, D.H., P.A. Grange, D.H. Zeman, D.R. Baker,
R. Sun and A.K. Erickson. 1998. Expression
of mucin-type glycoprotein K88 receptors
strongly correlation with piglet susceptibility
to K88 enterotoxigenic *Escherichia coli*, but
adhesion of this bacterium to brush borders
does not. *Infect. Immun.* 66: 4050-4055.
- Grange, P.A., M.A. Mouricout, S.B. Levery, D.H.
Francis and A.K. Erickson. 2002. Evaluation
of receptor binding specificity of
Escherichia coli K88 (F4) fimbrial adhesion
variants using porcine serum transferrin and
glycosphingolipids as model receptors.
Infect. Immun. 70: 2336-2343.
- Hermes, M., H. Osswald and D. Kloor. 2006. Role of
S-adenosylhomocysteine hydrolase in
adenosine induced apoptosis in HepG2
cells. *Exp. Cell Res.* 313: 264-283.
- Hsiung, H.M., D.L. Smiley, X.Y. Zhang, L. Zhang, L.Z.
Yan, L. Craft, M.L. Heiman and D.P. Smith.
2005. Potent peptide agonists for human
melanocortin 3 and 4 receptors derived from
enzymatic cleavages of human β -MSH(5-22)
by dipeptidyl peptidase I and dipeptidyl
peptidase IV. *Peptides* 26: 1988-1996.
- Hu, Z.L., J. Hasler-Rapacz, S.C. Huang and J.
Rapacz. 1993. Studies in swine on
Inheritance and variation in expression of
small intestinal receptors mediating adhesion
of the K88 enteropathogenic *Escherichia coli*
variants. *J. Hered.* 84: 157-165.
- Meijerink, E., S. Neuenschwander, R. Fries, A. Dinter,
H.U. Bertschinger, G. Stranzinger and P.
Vögeli. 2000. A DNA polymorphism
influencing alpha(1,2) fucosyltransferase
activity of the pig *FUT1* enzyme determines
susceptibility of small intestinal epithelium to
Escherichia coli F18 adhesion.
Immunogenetics 52: 129-136.
- Python, P. 2003. Genetic host determinants
associated with the adhesion of *E. coli* with
fimbriae F4 in swine. Ph.D. Thesis, Swiss
Federal Institute of Technology, Zurich.
- Python, P., H. Jörg, S. Neuenschwander, C. Hagger,
C. Stricker, E. Bürgi, H.U. Bertschinger, G.
Stranzinger and G. Vögeli. 2002. Fine-
mapping of the intestinal receptor locus for
enterotoxigenic *Escherichia coli* F4ac on
porcine chromosome 13. *Anim. Genet.* 33:
441-447.

Sellwood, R. 1980. The interaction of the K88 antigen with porcine intestinal epithelial cell brush borders. *Biochim. Biophys. Acta* 632: 326-335.

Van den Broeck, W., E. Cox, B. Oudega and B.M. Goddeeris. 2000. The F4 fimbrial antigen of

Escherichia coli and its receptors. *Vet. Microbiol.* 71: 223-244.

Qi, X.H., Q. Zhang, P.Q. Liu, C.Y. Song and R.H. Xu. 2004. Screening specifically expressed ESTs related to piglet diarrhea resistance. *Acta Genetica Sinica.* 31: 251-256.

JOURNAL OF AGRICULTURE

A Technical Journal of Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

Volume 23, No. 1 February 2007

Effect of Bagging on Growth and Ripening of Litchi Fruit cv. Hong Huay	
Wuthidech Bureerak and Pittaya Sruamsiri.....	1
Effect of Potassium Chlorate in Combination with Paclobutrazol on Flowering of Lychee cv. Chakrapat	
Watcharapon Singhagun and Tanachai Pankasemsuk.....	11
Improvement of F ₁ Hybrid Chili Using Male Sterility	
Jutamas kumchai and Maneechat Nikronpun.....	17
Enhancing the Viability of Sweet Pepper Synthetic Seed Using Absciscic Acid	
Piyachai Preamvaranon, Sa-nguansak Thanapornpoonpong and Suchada Vearasilp.....	25
Development of Sweet Pepper Synthetic Seed Production Technique	
Suchada Vearasilp, Piyachai Preamvaranon and Sa-nguansak Thanapornpoonpong.....	31
Genetic Analysis of Native Silkworm, Nangnoi Si Sa Ket 1 Variety, by RAPD-PCR Technique	
Jaruwan Chantira, Jiraporn Tayutivutikul, Angsana Akarapisan, Tipanee Senawong and Weerathep Pongprasert.....	39
Efficacies of Plant Essential Oils in Controlling Bakanae Disease of Rice Seedling	
Saichon Nochai and Sombat Srichuwong.....	49
Efficacies of Antagonistic Fungi from Rice Seeds cv. KDML 105 for Controlling Bakanae Disease in Rice Seedling	
Saichon Nochai and Sombat Srichuwong.....	59
Impact of a Lecture-based Intervention on Knowledge and Awareness of Plant Growth	
Promoting Rhizobacteria as a Biological Control Measure Among Farmers in Phitsanulok, Thailand	
Kanchalee Jetiyanon, Pinyupa Plianbangchang and Piyarat Nimpitakpong.....	67
Identification of Resistant Gene Against Escherichia coli Causing Diarrhea in Pre-weaned Pigs Using DDRT-PCR Technique	
Chirapiphat Phraephaisarn, Supamit Mekchay and Pacharin Krutmuang.....	79

ISSN 0857-0841