



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์

วิทยาศาสตร์

สาขา

สายวิชา

เรื่อง การวินิจฉัยโรคและพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจของเชื้อสาเหตุโรคผลแกนในสับปะรด

Identification and Developing the DNA Probe of the Causal Agent of Marble Fruit Disease in Pineapple

นามผู้วิจัย นายเทอดพงษ์ คงสนุ่น

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ศิริภัทร์ พรหมณีย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ศศิธร วุฒินิชย์, M.Sc.)

หัวหน้าสายวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนวรรณ พาณิชพัฒน์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวินิจฉัยโรคและพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจของเชื้อสาเหตุโรคผลแกนในสับปะรด

Identification and Developing the DNA Probe of the Causal Agent of Marble Fruit Disease in
Pineapple

โดย

นายเทอดพงษ์ คงสนุ่น

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรชีวผลิตภัณฑ์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทอดพงษ์ คงสนุ่น 2555: การวินิจฉัยโรคและพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจของเชื้อสาเหตุโรค
ผลแกนในสับปะรด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ สายวิชาวิทยาศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์สิริภัทร พรหมณีย์, Ph.D. 86 หน้า

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากของประเทศไทย มีมูลค่าการส่งออกเป็นรายใหญ่
ของโลก แต่มีปัญหาโรคผลแกนซึ่งเป็นโรคสำคัญที่สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อสับปะรดที่
ปลูกในประเทศไทยและทั่วโลกเป็นอย่างมาก การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจ
ของเชื้อสาเหตุโรคผลแกนในสับปะรดเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้การตรวจวินิจฉัยโรคทำได้ง่าย
รวดเร็วและตรวจพบเชื้อได้แม้มีเพียงปริมาณน้อย การสกัดดีเอ็นเอเป็นขั้นตอนแรกในการพัฒนาดี
เอ็นเอตัวตรวจ เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มีความจำเพาะต่อ
Pantoea stewartii เชื้อก่อโรคผลแกนในสับปะรด โคลนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่
พอลิเมอร์ วิเคราะห์ลำดับเบส ตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายจากการโคลนด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ
EcoRI สร้างดีเอ็นเอตัวตรวจโดยการติดฉลากที่ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย digoxigenin โดยใช้เทคนิค
dot blot hybridization ในการตรวจสอบตัวอย่าง ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้มีความไว และจำเพาะต่อ
เชื้อ *Pantoea stewartii* สาเหตุของโรคผลแกนในสับปะรด ดีเอ็นเอตัวตรวจสามารถตรวจสอบเชื้อ
สาเหตุของโรคผลแกนได้ทั้งในผลสับปะรดและตัวอย่างดิน การสุ่มตรวจตัวอย่างดินก่อนปลูก
สับปะรดด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจนี้จะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคผลแกน และป้องกันการแพร่
ระบาดของโรคผลแกนในสับปะรดได้

Therdpong Khongsanun 2012: Identification and Developing the DNA Probe of the Causal Agent of Marble Fruit Disease in Pineapple. Master of Science (Bioproducts Science), Major Field: Bioproducts Science, Division of Science. Thesis Advisor: Associate Professor Siripatr Prammanee, Ph.D. 86 pages.

Pineapple is an important commercial crop in Thailand. The export value is the big volume in the world. Marbling disease causes damage economic to pineapple both in Thailand and around the world. This research developed the DNA probe for diagnosis the causal bacteria of marbling disease. This technique is important, fast and need small amount of DNA samples. DNA extraction is the first step to developing DNA probe. The polymerase chain reaction technique was particular to *Pantoea stewartii*, bacterial disease of pineapple. Target DNA clones derived from the polymerase chain reaction product and DNA sequencing was analysed. DNA probe was created by labeling with digoxigenin. The samples were detected by dot blot hybridization method. DNA diagnosis was fast and particular to *Pantoea stewartii*. The DNA probe was able to detect bacteria causal agent of marbling disease both in pineapple fruit and soil samples. Random DNA testing of soil samples before planting pineapple decreased risks of marbling disease and prevent spreading of marbling disease in pineapple.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ศิริภัทร์ พราหมณ์ย์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงสำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำอบรมชี้แนะ ให้ความรู้และคำแนะนำ
ในการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ศศิธร วุฒิวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมเป็นอย่างสูง
สำหรับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำอบรมชี้แนะ ให้ความรู้และคำแนะนำในการทดลอง เพื่อความ
สมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ทุนวิชัยมหานัฒนิจิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้
โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว. – อุดสาหกรรม ในการสนับสนุนเงินทุนวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ไพบุลย์ กวินเลิศวัฒนา บริษัทไทยออร์คิดส์แลปจำกัด ในการ
สนับสนุนเงินทุนวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุนและให้กำลังใจตลอดมา

เทอดพงษ์ คงสนุ่น
พฤษภาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	33
ผล	33
วิจารณ์	48
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	52
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	53
ภาคผนวก	61
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	62
ภาคผนวก ข ข้อมูลสืบประวัติ	65
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ข้อกำหนดเรื่องขนาด (size specification) ของสับปะรด
2	การเปรียบเทียบข้อมูลคุณลักษณะของเชื้อ <i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> และเชื้อใกล้เคียง
3	ผลการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรททั้ง 95 ชนิด จาก GN2 MicroPlate™ (ภาพที่ 6) และอ่านผลด้วยเครื่อง Microlog™ System
4	การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system โดยพื้นฐานข้อมูล MicroLog™
5	การวิเคราะห์ลำดับเบสโดยพื้นฐานข้อมูลของ NCBI/ BLAST

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เนื้อสับปะรดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมีอาการโรคผลแกน จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เป็นไต แข็ง	12
2 วิธีการการแยกเชื้อบริสุทธิ์ 2A วิธี Tissue transplanting method และ 2B วิธี Cross streak	26
3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสับปะรดที่แสดงอาการโรคผลแกน อายุประมาณ 24-48 ชั่วโมง 3A บนอาหาร Endo agar โคโลนีสีแดงเข้ม กลมมน ผิวเรียบ และเหลือบแสง และ 3B บนอาหาร NGA โคโลนีเล็ก สีขาวนุ่น และขาวอมเหลือง	33
4 การปลูกเชื้อ (Inoculate) ลงบนแผ่นสับปะรดที่ทำไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เพื่อดูการเกิดอาการของโรคผลแกน 4A ปลูกเชื้อ 3 วัน เริ่มแสดงอาการของโรคผลแกน, 4B ปลูกเชื้อ 6 วัน แสดงอาการของโรคผลแกนชัดเจนขึ้น และ 4C ปลูกเชื้อ 9 วัน ลักษณะเนื้อสีน้ำตาลเข้ม แข็งเป็นไต และแสดงอาการชัดเจนที่สุด	34
5 การย้อมสีแกรมของเชื้อ <i>Pantoea (Erwinia) stewartii</i> พบว่าเป็นเชื้อแกรมลบ (Gram negative) เซลล์ติดสีแดงของ Safranin-O ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า	34
6 แหล่งคาร์บอนในอาหาร GN2 MicroPlate™ ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์และจำแนกเชื้อกลุ่มแกรมลบ (Gram negative)	36
7 Genomic DNA บน 1 % Agarose gel โดยที่ M = Lambda DNA-Hind III Digest, H = สับปะรดที่ปกติ, D = สับปะรดที่เป็นโรคผลแกน และ E = เชื้อ <i>Erwinia stewartii</i>	39
8 Genomic DNA ส่วนต่างๆ ของสับปะรด บน 1 % Agarose gel โดยที่ M = Lambda DNA-Hind III Digest, (1-4 = ผล, ใบ, จุก และหน่อ ที่ปกติตามลำดับ) และ (5-8 = ผล, ใบ, จุก และหน่อ ที่เป็นโรคผลแกนตามลำดับ)	39
9 Genomic DNA ของตัวอย่างดิน บน 1 % Agarose gel โดยที่ M = Lambda DNA-Hind III Digest, 1-12 = ดิเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างดินจากแปลงปลูกสับปะรดต่างๆ ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10	วิเคราะห์ PCR product บน 1.5 % Agarose gel โดยที่ M = 100 bp DNA Ladder, H = สับปะรดที่ปกติ, D = สับปะรดที่เป็นโรคผลแกน และ E = เชื้อ <i>Erwinia stewartii</i>
11	นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) โดยที่ M = 100 bp DNA Ladder และ 1 = PCR product ที่ใช้ในการโคลน
12	Genomic DNA การสกัด plasmids ทั้ง 5 ตัวอย่างโคลน ตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel โดยที่ M1 = Lambda DNA- <i>Hind III</i> Digest และ 1-5 = โคลนดีเอ็นเอ
13	แสดง Restriction endonuclease digestion ของ Genomic DNA ที่ได้จากการสกัด plasmids ทั้ง 5 ตัวอย่างโคลนนี้ โดยใช้ <i>EcoRI</i> ในการตัด ตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel โดยที่ M1 = Lambda DNA- <i>Hind III</i> Digest, M2 = 100 bp DNA Ladder และ 1-5 = โคลนดีเอ็นเอ
14	Inserted DNA มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) โดยที่ M = 100 bp DNA Ladder และ 1 = Inserted DNA ที่ใช้ติดฉลากด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)
15	ผลการทำปฏิกิริยาไฮบริดเชชันด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะกับโรคผลแกน กับส่วนต่างๆของสับปะรด (1) และตัวอย่างดินที่ปลูกสับปะรด ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (2) โดยที่ A = โคลน และ B = น้ำกลั่น

การวินิจฉัยโรคและพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจของเชื้อสาเหตุโรคผลแกนในสับปะรด

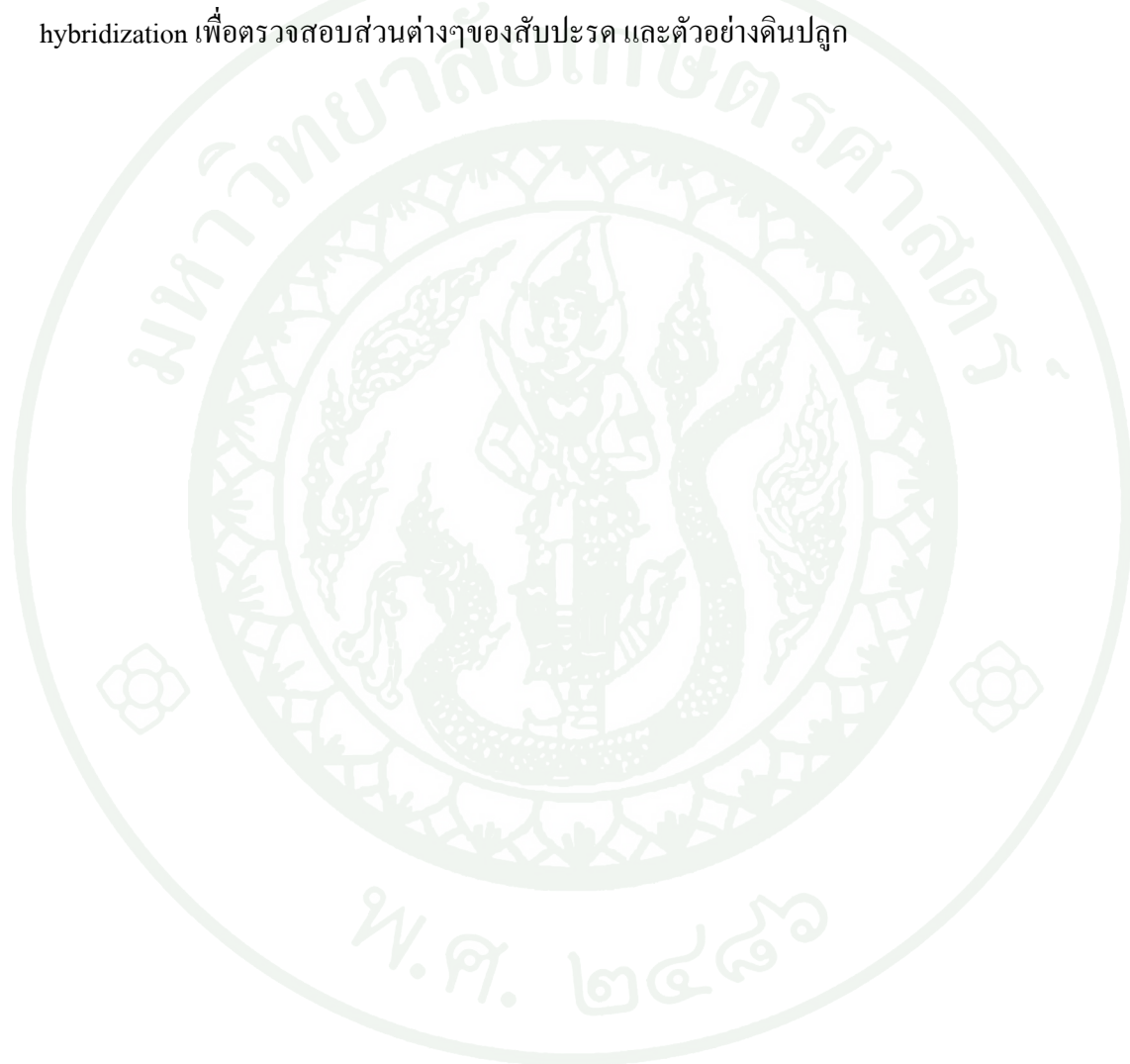
Identification and Developing the DNA Probe of the Causal Agent of Marble Fruit Disease in Pineapple

คำนำ

สับปะรดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์ Bromeliaceae ในสกุล *Ananas* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* (L.) Merr ไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสินค้าผักผลไม้กระป๋องรายใหญ่ของโลก โดยเป็นผู้นำในการส่งออกสินค้าสับปะรดกระป๋อง และน้ำสับปะรด เนื่องจากประเทศไทยมีโรงงานผลิตได้มาตรฐานอาหารปลอดภัยตามมาตรฐานสากล ไม่ว่าจะเป็น มาตรฐาน HACCP และ GMP (กรมส่งเสริมการค้าส่งออก, 2555) พื้นที่เพาะปลูกสับปะรดทั้งประเทศ 659,625 ไร่ เนื้อที่เก็บเกี่ยว 646,331 ไร่ ผลผลิต 2,593,207 ตัน โดยมีพื้นที่เพาะปลูกสูงสุดที่ภาคกลาง 511,424 ไร่ ภาคเหนือ 86,733 ไร่ ตะวันออกเฉียงเหนือ 22,626 ไร่ และภาคใต้ 2,430 ไร่ ตามลำดับ จังหวัดที่ปลูกมากที่สุด ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ มูลค่าการส่งออกสับปะรดในปี พ.ศ. 2554 คือ 26,114,087,160 บาท โดยสับปะรดบรรจุกระป๋องมีมูลค่าส่งออกมากที่สุดคือ 19,130,572,214 บาท รองลงมาคือน้ำสับปะรด สับปะรดสดแช่แข็ง และสับปะรดแห้งตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) มาตรฐานสับปะรดที่ผ่านการเก็บเกี่ยวอย่างถูกต้อง ตามกระบวนการเก็บเกี่ยว และการดูแลรักษาเพื่อให้ได้คุณภาพเป็นที่ยอมรับได้เมื่อถึงโรงงาน ลักษณะผลสับปะรด ต้องไม่มีการแคะจุกหรือเจาะจุก มีความสดทั้งผล สุกได้ที่ไม่มีกลิ่นและรสผิดปกติ ไม่มีจุกและก้าน ไม่มีเชื้อราที่ขั้ว ไม่ปนเปื้อน ปราศจากอาการผลแกน ไม่ขำหรือมีดำหนิเห็นเด่นชัด ซึ่งเกิดจากรอยมีดของมีคม ปลอดศัตรูพืชและความเสียหายอันเนื่องจากศัตรูพืช (กรมวิชาการเกษตร, 2545)

โรคผลแกนเป็นโรคที่ทำความเสียหายต่อสับปะรดเป็นอย่างมาก โรคนี้เกิดจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างเชื้อแบคทีเรียกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการหดตัวและขยายตัวของผล จึงทำให้เกิดรอยแตกให้เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ผลสับปะรด โดยเฉพาะบริเวณตาสับปะรด อาจมีไรแดงระบาด ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียเข้าสู่ผลได้ง่ายขึ้น (เกลียวพันธุ์, 2551) เนื้อสับปะรดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เป็นไตแข็ง ไม่ยืดหยุ่นเหมือนเนื้อสับปะรดปกติ ค่าความเป็นกรด และเปอร์เซ็นต์น้ำตาลลดลง ไม่สามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอกของผลสับปะรด จะรู้ที่เกิดอาการผลแกน เมื่อสุ่มตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลผลิตขณะส่งโรงงาน

อุตสาหกรรมแปรรูป และพบได้เมื่อจะบริโภคผลสด (กรมวิชาการเกษตร, 2546) การระบาดรุนแรงทำความเสียหายได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ โดยคิดเป็นมูลค่าความเสียหายมากกว่า 13,000,000,000 ล้านบาทต่อปี การตรวจสอบเชื้อก่อนการปลูกซึ่งเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับเชื้อสาเหตุโรคผลแกนในสับปะรด เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรค และการแพร่ระบาดของเชื้อ เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และเพื่อยืนยันเชื้อสาเหตุโรคผลแกน การโคลนยีนเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอตัวตรวจ เพื่อใช้ในการทำ dot blot hybridization เพื่อตรวจสอบส่วนต่างๆของสับปะรด และตัวอย่างดินปลูก



วัตถุประสงค์

1. การวินิจฉัยโรคผลแกนของสับปะรด จากแปลงปลูกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์
2. พัฒนาคีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคผลแกนในสับปะรด



ตรวจเอกสาร

1. ความสำคัญของสับปะรดต่อเศรษฐกิจ

ความสำคัญของสับปะรดต่อเศรษฐกิจ พื้นที่เพาะปลูกสับปะรดทั้งหมดในประเทศไทยปี พ.ศ.2554 มี 659,625 ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2553 ที่มี 615,543 ไร่ โดยภาคกลางมีเนื้อที่เพาะปลูกมากที่สุด ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และผลผลิตรวมทั้งประเทศในปี พ.ศ. 2554 ได้ 2,593,207 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2553 ที่ได้ 1,966,143 ตัน คิดเป็นร้อยละ 31.89 และมูลค่าการส่งออกในปี พ.ศ. 2554 คือ 26,114,087,160 บาท โดยสับปะรดบรรจุกระป๋องมีมูลค่าส่งออกมากที่สุด รองลงมาคือน้ำสับปะรด สับปะรดสดแช่แข็ง และสับปะรดแห้งตามลำดับ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554)

ไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกสินค้าผักผลไม้กระป๋องรายใหญ่ของโลก โดยเป็นผู้นำในการส่งออกสินค้าสับปะรดกระป๋อง และน้ำสับปะรด เนื่องจากประเทศไทยมีโรงงานผลิตได้มาตรฐานอาหารปลอดภัยตามมาตรฐานสากล ไม่ว่าจะเป็น มาตรฐาน HACCP และ GMP (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2555)

เนื่องจากการแข่งขันทางการค้า ภายใต้อิทธิพลการค้าโลก (WTO) มีปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมทางการค้าเพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้มาตรการด้านสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (SPS) รวมทั้งสหภาพยุโรปมีมาตรการเพื่อให้สามารถตรวจสอบการผลิตได้ทุกขั้นตอน ตั้งแต่ไร่นาจนถึงผู้บริโภค ทำให้เกษตรกรและผู้ประกอบการผลิตสับปะรด ต้องปรับปรุงระบบการผลิตให้สามารถตอบสนองต่อกฎเกณฑ์ทางการค้าเหล่านี้ให้ได้อย่างครบถ้วน ฉะนั้นการวิจัยและพัฒนาเพื่อการผลิตสับปะรดที่มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค จึงต้องมีกระบวนการผลิตทุกขั้นตอนอย่างถูกต้อง มีความเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ ที่สำคัญคือ การผลิตพืชนั้นจะต้องได้รับผลตอบแทนคุ้มค่าการลงทุน ซึ่งแนวทางการผลิตสับปะรดที่มีคุณภาพตามมาตรฐานนั้น จะต้องนำคำแนะนำเกษตรกรที่เหมาะสมสำหรับการปลูกสับปะรดของกรมวิชาการเกษตรไปปฏิบัติการปลูกสับปะรดให้มีมาตรฐานโรงงานแปรรูปและบริโภคสดเพื่อการส่งออก จะต้องคัดเลือกพันธุ์ที่ผลผลิตมีคุณภาพตรงตามที่ตลาดต้องการ มีการเจริญเติบโตดีเหมาะสมสำหรับสภาพภูมิอากาศของแหล่งปลูกนั้นๆ เช่น พันธุ์ปัตตาเวีย เหมาะสำหรับส่งโรงงาน และปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วไปในแหล่งปลูกสำคัญ แต่พันธุ์นางแลเหมาะสมสำหรับปลูกที่ตำบลนางแล อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย จะให้รสชาติดีสำหรับบริโภคสด เป็นต้น นอกจากคัดเลือกพันธุ์ที่เหมาะสมแล้ว การจัดการด้านเกษตรกรรมเช่น การเตรียมดิน การจัดการธาตุอาหารให้ได้ตามความต้องการของสับปะรดในแต่ละแปลง

ปลูก และการจัดการศัตรูพืชตามคำแนะนำเกษตรกรที่เหมาะสมสำหรับสับปะรด เป็นปัจจัยสำคัญที่นำไปสู่การผลิตสับปะรดให้ได้ผลผลิตสูงและมีคุณภาพ (วิจิตร, 2539; กรมวิชาการเกษตร, 2545)

สถานการณ์การผลิตสับปะรดของไทยมีปัญหาหลายประการ เริ่มจากเมื่อมีการขยายพื้นที่ปลูกอย่างกว้างขวางในระหว่างปี พ.ศ. 2526-2536 และสภาพดินฟ้าอากาศแปรปรวนในแต่ละปี ทำให้ปริมาณผลผลิต ไม่แน่นอน เกิดความผันผวนของราคา เกษตรกรไม่มีความมั่นคงในรายได้ รวมทั้งผู้ประกอบการก็ประสบปัญหาการผลิตสินค้าแปรรูป และการแข่งขันกันในตลาดโลก ฉะนั้นสถานะการผลิตสับปะรดทั้งของเกษตรกรผู้ผลิตวัตถุดิบ และโรงงานแปรรูปจึงไม่มีความแน่นอน และเป็นปัญหาต่อเนื่องตลอดมา (วิจิตร, 2545)

2. มาตรฐานสับปะรด

กรมวิชาการเกษตร (2545) กำหนดเกณฑ์มาตรฐานสับปะรดโรงงาน และบริโภคนัด ดังนี้

1. สับปะรดโรงงาน

1.1 ข้อกำหนดเรื่องคุณภาพ (Provisions concerning quality)

1.1.1 คุณภาพขั้นต่ำ (minimum requirements) ต้องเป็นสับปะรดที่ผ่านการเก็บเกี่ยวอย่างถูกต้อง ตามกระบวนการเก็บเกี่ยว และการดูแลรักษาเพื่อให้ได้คุณภาพเป็นที่ยอมรับได้ เมื่อถึงโรงงาน ลักษณะผลสับปะรดต้องไม่มีการแคะจุกหรือเจาะจุก มีความสดทั้งผล สุกได้ที่ไม่มีกลิ่นและรสผิดปกติ ไม่มีจุกและก้าน ไม่มีเชื้อราที่จุก ไม่ปนเปื้อนสิ่งแปลกปลอม เช่น ทราย น้ำมัน ปราศจากอาการผลแกน ไม่ช้ำหรือมีดำหนิเห็นเด่นชัด ซึ่งเกิดจากรอยมีดของมีคม ปลอดศัตรูพืช และความเสียหายอันเนื่องจากศัตรูพืช

1.1.2 การแบ่งชั้นคุณภาพ (classification) เป็นชั้นหนึ่ง และชั้นสอง

สภาพความสมบูรณ์ภายนอก สับปะรดต้องมียอดดี ตรงตามพันธุ์ ปลอดจากศัตรูพืช ผลปลอดจากดำหนิ หรือมีดำหนิเล็กน้อย โดยไม่มีผลต่อรูปลักษณะ คุณภาพและคุณภาพการเก็บรักษา มีขนาดตามข้อกำหนดขนาด

สภาพความสมบูรณ์ภายใน ทุกชั้นคุณภาพ เนื้อสับปะรดต้องมีลักษณะปกติ มีความสุกไม่น้อยกว่าร้อยละ 25 หรือสุกมากเกินไป และมีในเตรทในเนื้อสับปะรดไม่เกิน 25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 1 ข้อกำหนดเรื่องขนาด (size specification) ของสับปะรด

ชั้นคุณภาพ	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)	ความยาวผล (เซนติเมตร)
ชั้นหนึ่ง (class 1)	10.5 – 15.5	ไม่น้อยกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางผล
ชั้นสอง (class 2)	9.0 – 10.4	ไม่น้อยกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางผล

ที่มา: เกลียวพันธุ์ (2551)

1.2 ข้อกำหนดเรื่องการบรรจุและการขนส่ง (packing and transportation)

ต้องจัดเรียงผลสับปะรดในพาหนะขนส่งให้เป็นระเบียบและแน่น เพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดจากการกระแทก พาหนะขนส่งต้องสะอาด ปราศจากกลิ่นแปลกปลอม และต้องควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนที่มีผลต่อคุณภาพสับปะรดระหว่างขนส่ง

1.3 เอกสารประกอบการขาย (sales document)

ต้องมีชื่อที่อยู่ผู้ขาย และระบุจังหวัดแหล่งผลิตในประเทศไทย

1.4 สารปนเปื้อน (contaminants)

ห้ามใช้สารเคมีที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ไม่อนุญาต ห้ามใช้สารเร่งให้สับปะรดสุก โดยไม่ได้รับคำแนะนำจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นอันตราย

1.5 สุขลักษณะ (hygiene)

ผลผลิตในมาตรฐานดังกล่าวให้ดำเนินการไปตามหลักทั่วไป ของการปฏิบัติ
ถูกต้องทางการเกษตร (good agricultural practice)

1.6 เกณฑ์การตรวจสอบและการวิเคราะห์ตัวอย่าง (sampling and analysis procedures)

1.6.1 เกณฑ์การตรวจสอบตัวอย่าง

รถบรรทุกขนาดเล็ก สุ่มไม่น้อยกว่า 2 ครั้ง ละครึ่ง 20 ผล หรือต้นละ 16 ผล

รถบรรทุกขนาดใหญ่ (10 ล้อ 6 ล้อ) สุ่มไม่น้อยกว่า 3 ครั้ง ละครึ่งไม่น้อยกว่า
20 ผล หรือต้นละไม่น้อยกว่า 10 ผล

1.6.2 เกณฑ์การวิเคราะห์ไนเตรท ด้วยวิธีรวดเร็วที่กึ่งกลางผล ความลึก 2.5-3.75
เซนติเมตร จากผิวเปลือก โดยใช้ไนเตรทสตริป (nitrate strip) และเทียบกับค่ามาตรฐาน

2. สัมประรดสด

2.1 ข้อกำหนดเรื่องคุณภาพ (provisions concerning quality)

2.1.1 คุณภาพขั้นต่ำ (minimum requirements) ต้องเป็นสับประรดที่ผ่านการเก็บ
เกี่ยวอย่างถูกต้อง ตามกระบวนการเก็บเกี่ยว และการดูแลรักษา เพื่อให้ได้คุณภาพเป็นที่ยอมรับได้
เมื่อถึงผู้บริโภค ลักษณะผลสับประรดต้องไม่มีการแคะจุกหรือเจาะจุก มีความสดทั้งผล สุกได้ที่ ไม่มี
กลิ่นและรสผิดปกติ มีหรือไม่มีจุกและก้าน ไม่มีเชื้อราที่ขั้ว ไม่ปนเปื้อนสิ่งแปลกปลอม เช่น ทราย
หรือน้ำมัน ปราศจากอาการผลแกน ไม่ซ้ำหรือมีตำหนิเห็นเด่นชัด ซึ่งอาจเกิดจากรอยมีดของมีคม
ปลดจากศัตรูพืช และความเสียหายอันเนื่องจากศัตรูพืช สับประรดต้องมีความหวานที่บริเวณ
กึ่งกลางผลไม่น้อยกว่า 11 องศาบริกซ์

2.1.2 การแบ่งชั้นคุณภาพ (classification) แบ่งเป็น 3 ชั้นคุณภาพ ดังนี้

ก. ชั้นพิเศษ (extra class) ผลสับปะรดในชั้นนี้ต้องมีคุณภาพดีที่สุด ตรงตามพันธุ์ ผลต้องปลอดจากตำหนิ ยกเว้นผิวผิวนเล็กน้อย โดยไม่มีผลต่อรูปลักษณะทั่วไปของผลิตผล คุณภาพและคุณภาพการเก็บรักษารวมทั้งการจัดเรียงในภาชนะบรรจุ ถ้าสับปะรดมีจุดติดอยู่ จุดต้องเป็นจุดเดี่ยว ตรง ไม่มีแขนง และมีความยาวระหว่าง 0.5-1.5 เท่าของความยาวผล

ข. ชั้นหนึ่ง (class 1) สับปะรดชั้นนี้ต้องมีคุณภาพดี ตรงตามพันธุ์ มีตำหนิได้เล็กน้อย ด้านรูปทรง สี และผิว โดยไม่มีผลต่อรูปลักษณะ คุณภาพ และคุณภาพการเก็บรักษารวมทั้งการจัดเรียงในภาชนะบรรจุ ตำหนิผิวโดยรวมต่อผลต้องมีพื้นที่ไม่เกินร้อยละ 4 ของพื้นผิวทั้งหมด โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อสับปะรด ถ้าสับปะรดมีจุดติดอยู่ จุดต้องเป็นจุดเดี่ยว ตรง หรือโค้งได้เล็กน้อย ไม่มีแขนง และมีความยาวระหว่าง 0.5-1.5 เท่าของความยาวผล

ค. ชั้นสอง (class 2) ชั้นนี้รวมผลสับปะรดที่ไม่เข้าชั้นชั้นที่สูงกว่า มีตำหนิได้เล็กน้อย ด้านรูปทรง สี และผิว โดยไม่มีผลต่อรูปลักษณะ คุณภาพ และคุณภาพการเก็บรักษารวมทั้งการจัดเรียงในภาชนะบรรจุ ตำหนิผิวโดยรวมต่อผลต้องมีพื้นที่ไม่เกินร้อยละ 8 ของพื้นผิวทั้งหมด โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อสับปะรด ถ้าสับปะรดมีจุดติดอยู่ จุดอาจเป็นจุดเดี่ยวหรือจุดคู่ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย ไม่มีแขนง และมีความยาวระหว่าง 0.5-1.5 เท่าของความยาวผล

2.2 ข้อกำหนดเฉพาะเรื่องขนาด (provisions concerning sizing)

ขนาดของผลจะพิจารณาจากน้ำหนักของแต่ละผล หรือน้ำหนักเฉลี่ยของผล สับปะรดทั้งหมดในแต่ละภาชนะบรรจุ ซึ่งอนุญาตให้มีน้ำหนักมากกว่า หรือน้อยกว่าน้ำหนักผลของแต่ละขนาดไม่เกินร้อยละ 12 ทั้งนี้ต้องมีน้ำหนักเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 350 กรัม ยกเว้นสับปะรดพันธุ์พันธุ์ที่มีผลขนาดเล็กในกลุ่มควิน เช่น ตราดสีทอง ภูเก็ต และสวี ซึ่งยอมให้มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 250 กรัม ผลสับปะรดชนิดมีจุก กำหนดขนาด 400-2,700 กรัม ($\pm 12\%$) ผลสับปะรดชนิดไม่มีจุก กำหนดขนาด 330-2,200 กรัม ($\pm 12\%$)

2.3 ข้อกำหนดเกณฑ์ความคลาดเคลื่อน (provisions concerning tolerance)

2.3.1 เกณฑ์ความคลาดเคลื่อนเรื่องคุณภาพ (quality tolerance)

ก. ชั้นพิเศษ ยอมให้ผลสับปะรดที่มีคุณภาพไม่เป็นไปตามข้อกำหนดของชั้นพิเศษ แต่เป็นไปตามคุณภาพของชั้นหนึ่งปนมาได้ไม่เกินร้อยละ 6 ของจำนวนผลทั้งหมดหรือน้ำหนักรวม

ข. ชั้นหนึ่ง ยอมให้สับปะรดที่มีคุณภาพไม่เป็นไปตามข้อกำหนดของชั้นหนึ่ง แต่เป็นไปตามคุณภาพของชั้นสองปนมาได้ไม่เกินร้อยละ 10 ของจำนวนผลทั้งหมดหรือน้ำหนักรวม

ค. ชั้นสาม ยอมให้สับปะรดที่มีคุณภาพไม่เป็นไปตามข้อกำหนดของชั้นสองหรือไม่ได้คุณภาพชั้นต่ำ ปนมาได้ไม่เกินร้อยละ 10 ของจำนวนผลทั้งหมดหรือน้ำหนักรวม โดยไม่มีผลเน่าเสีย

2.4 ข้อกำหนดเรื่องการจัดเรียงเสนอ (provisions concerning presentation)

2.4.1 ความสม่ำเสมอ (uniformity) สับปะรดที่บรรจุในแต่ละภาชนะ ต้องสม่ำเสมอ มาจากแหล่งเดียวกัน และเป็นพันธุ์เดียวกัน มีคุณภาพ ขนาด และสีสม่ำเสมอ ส่วนของผลที่มองเห็นในภาชนะบรรจุ ต้องเป็นตัวแทนของทั้งหมด

2.4.2 การบรรจุหีบห่อ (packaging) ต้องบรรจุในภาชนะบรรจุที่เก็บรักษา สับปะรดได้เป็นอย่างดี วัสดุที่ใช้บรรจุต้องสะอาดและมีคุณภาพ เพื่อป้องกันความเสียหายอันจะมีผลต่อสับปะรด การปิดฉลากต้องใช้หมึกพิมพ์ หรือกาวที่ไม่เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค บรรจุภัณฑ์จะต้องมีคุณภาพ ถูกสุขลักษณะ ถ่ายเทอากาศได้ดี และมีคุณสมบัติทนทานต่อการปฏิบัติการขนส่ง และรักษาผลสับปะรดได้ บรรจุภัณฑ์ต้องปราศจากกลิ่นและวัตถุแปลกปลอม

2.5 เครื่องหมายหรือฉลาก (marking or labelling)

2.5.1 บรรจุภัณฑ์สำหรับผู้บริโภคสุดท้าย (Consumer packages) ประเภทของ
ผลิตผล (nature of product) ให้ปิดฉลากคำว่า สับปะรด และชื่อพันธุ์

2.5.2 บรรจุภัณฑ์สำหรับขายส่ง (non-retail containers) ต้องประกอบด้วย
ข้อความดังต่อไปนี้

ก. ข้อมูลผู้ขายส่ง (identification) ต้องระบุชื่อ ที่อยู่ของผู้ขายส่ง ผู้บรรจุ
และจะระบุหมายเลขรหัสสินค้า ด้วยก็ได้

ข. ประเภทของผลิตผล (nature of produce) ให้ปิดฉลากคำว่า สับปะรด
และชื่อพันธุ์

ค. ข้อมูลแหล่งผลิต (origin of produce) ต้องระบุประเทศไทย และจังหวัด
แหล่งผลิตในประเทศไทยด้วยก็ได้

ง. ข้อมูลเชิงพาณิชย์ (commercial identification)

- 1) ชั้นคุณภาพ (class)
- 2) ขนาด (size)
- 3) จำนวน (ผล) (number of units)
- 4) น้ำหนักสุทธิ (net weight)
- 5) เครื่องหมายการตรวจสอบทางราชการ (official inspection mark)

2.6 สุขลักษณะ (hygiene) ผลิตผลในมาตรฐานนี้ให้ดำเนินการไปตามหลักเกษตรที่ดีที่
เหมาะสม (good agricultural practice)

3. โรคผลแกน (marbling disease, marble fruit, bacterial fruit rot)

สาเหตุของโรคเกิดจากปฏิกิริยาร่วมระหว่างเชื้อแบคทีเรีย *Pantoea stewartii* (*Erwinia stewartii*) กับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของผล สับปะรดเปลี่ยนแปลงกะทันหัน (กรมวิชาการเกษตร, 2546; Rohrbach, 1983)

ลักษณะอาการ โรคผลแกนเป็นอาการเกิดมากในระยะผลแก่ ประมาณ 7-10 วันก่อนเก็บเกี่ยว ซึ่งสภาพอากาศเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว ร่วมกับการใส่ปุ๋ยและการบำรุงรักษาไม่ถูกต้อง เริ่มตรวจพบอาการเมื่อประมาณ 1 เดือนก่อนเก็บเกี่ยว (วิชัย และคณะ, 2546)

สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงรวดเร็ว ทำให้เกิดการหดตัวและขยายตัวของผล จึงทำให้เกิดรอยแตกให้เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ผลสับปะรด โดยเฉพาะบริเวณตาสับปะรด เชื้ออาจเข้าสู่ผลสับปะรดตั้งแต่ระยะดอกบาน โดยผ่านเข้าทางช่องโคนด้านเกสรตัวผู้ หรือท่อน้ำหวานภายในดอก แล้วพักตัวอยู่ใน ออสมิไรแดงระบาด ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียเข้าสู่ผลได้ง่ายขึ้น เนื้อสับปะรดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เป็นไตแข็ง ไม่ยืดหยุ่นเหมือนเนื้อสับปะรดปกติ ไม่สามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอกของผลสับปะรด จะรู้ว่าการเกิดอาการผลแกน เมื่อสุ่มตรวจวิเคราะห์คุณภาพผลผลิตขณะส่งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป และพบได้เมื่อจะบริโภคผลสด (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

สับปะรดที่มีอาการโรคผลแกน เนื้อแข็งเป็นไตสีน้ำตาลเข้ม ค่าความเป็นกรดและ % น้ำตาลลดลง การให้ปุ๋ยไนโตรเจนมากเกินไป การดูแลรักษาแปลงปลูกไม่ดีจะเกิดอาการผลแกนมาก การใช้สารกำจัดวัชพืชอัตราสูงเกินไป การใช้สารกำจัดวัชพืชในช่วงสับปะรดกำลังพัฒนาผลหรือใกล้เก็บเกี่ยว เป็นเหตุให้เกิดอาการผลแกนได้

เกลียวพันธ์ และคณะ (2543) พบว่า อาการผลแกนเกิดขึ้น 2.0-5.0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการพ่นสารกำจัดวัชพืชในระยะหลังบังคับดอก 2 เดือน และก่อนเก็บเกี่ยว 1 เดือน อาการผลแกนที่เกิดขึ้นยังพบว่าทำให้ค่าเฉลี่ยความหวาน (องศาบริกซ์) ลดลง 1.3 เปอร์เซ็นต์ (เกลียวพันธ์, 2551)

การแพร่ระบาด ช่วงเวลาที่อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว เช่น อากาศแล้งและร้อนจัดแล้วมีฝนตกทันที การเกิดอาการผลแกนอาจเกิดทั้งผล หรือเฉพาะภายในผลย่อย หรือ

บางส่วนของผล การระบาดของโรคทำความเสียหายได้ถึง 10 – 50 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตที่ส่งโรงงาน และผู้บริโภค หรือมากกว่านั้น (เกลียวพันธุ์, 2551)

การป้องกันกำจัดโรคผลแกน กรมวิชาการเกษตร (2546) แนะนำให้ปฏิบัติดังนี้

1. จัดระบบการปลูกสับปะรดที่เหมาะสม เน้นการเพิ่มจำนวนต้นต่อไร่ให้มากขึ้น เพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิในแปลงสับปะรดให้สม่ำเสมอ
2. ให้น้ำแก่ต้นสับปะรดให้ครบสูตร ลดปริมาณการใช้ไนโตรเจน โดยให้น้ำตามคำแนะนำ และให้โพแทสเซียมคลอไรด์ อัตรา 1 กิโลกรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่นหลังบังคับดอก 90-105 วัน
3. ให้สับปะรดได้รับความชื้นสม่ำเสมอ ตั้งแต่ช่วงบังคับดอกแล้ว ให้น้ำทันทีช่วงที่อากาศร้อนจัด
4. ควบคุมการระบาดของไรแดง เป็นระยะๆ ตลอดฤดูปลูก
5. ห้ามใช้สารกำจัดวัชพืชทุกชนิดในแปลงสับปะรดในระยะบังคับดอกไปแล้ว จนถึงเก็บเกี่ยวผลผลิต



ภาพที่ 1 เนื้อสับปะรดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายมีอาการ โรคผลแกน จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม เป็นไตแข็ง

4. ข้อมูลเชื้อ *Pantoea stewartii* ss *stewartii* (*Erwinia stewartii*)

เชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน ไม่เคลื่อนที่ ขนาดเซลล์ประมาณ $0.4-0.8 \times 0.9-2.2 \mu\text{m}$ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง $27-30^{\circ}\text{C}$ และอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อยังสามารถเจริญได้ $8-9^{\circ}\text{C}$ โดยแบคทีเรียนี้จะตายหมด (Thermal death point) ที่อุณหภูมิ 53°C (Pepper, 1967) เชื้อนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นของกลุ่มประเทศในทวีปอเมริกาเหนือ ได้แก่ ประเทศแคนาดา เม็กซิโก และสหรัฐอเมริกา ในทวีปอเมริกากลางและแคริบเบียน ได้แก่ สาธารณรัฐคอสตาริกา และเปอร์โตริโก ในทวีปอเมริกาใต้ ได้แก่ สาธารณรัฐโบลิเวีย สหพันธรัฐบราซิล สาธารณรัฐเปรู และสาธารณรัฐสหกรณ์กายอานา ในทวีปยุโรปและเมดิเตอร์เรเนียน ได้แก่ สาธารณรัฐออสเตรีย และในทวีปเอเชีย ได้แก่ สาธารณรัฐอินเดีย พืชอาศัยหลักของเชื้อแบคทีเรียนี้ คือ ข้าวโพด โดยสามารถเข้าทำลายได้ทั้งข้าวโพดหวาน ข้าวโพดไร่ ข้าวโพดข้าวเหนียว ข้าวโพดคั่วและข้าวโพดฝักอ่อน ซึ่งข้าวโพดหวานจะอ่อนแอต่อเชื้อแบคทีเรีนี้นามากที่สุด เชื้อนี้ถ่ายทอดผ่านแมลงพาหะ ได้แก่ด้วงหมัดข้าวโพด (corn flea beetle, *Chaetocnema pulicaria* Melsh.) ซึ่งจะเป็นที่อาศัยของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อข้ามฤดูหนาว แมลงพาหะเป็นปัจจัยสำคัญของการแพร่ระบาด (Pataky and Ikin, 2003) เชื้อ *Erwinia stewartii* หรือเรียกว่าเชื้อ *Pantoea stewartii* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เนื้อตาย และเหี่ยวแห้งในพืช ออร์แกนนิซึมของเชื้อนี้มีพลาสมิดจำนวนมาก ตั้งแต่ขนาด 4-318 กิโลเบส และ *E. stewartii* เป็นเป็นแบคทีเรีย Family Enterobacteriaceae พลาสมิดสามารถจำลองในเชื้อ *Escherichia coli* ได้ (Jen-Fen et al., 1998)

คุณสมบัติของเชื้อ Genus *Erwinia* แบคทีเรียในสกุล (Genus) *Erwinia* อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ, ไม่สร้างสปอร์, มี flagella รอบตัว (peritrichous flagella), สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มี หรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic), มีรูปร่างท่อนตรง (rod shaped) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียใน สกุล *Erwinias* นี้มีรายงานว่าเป็นเชื้อเกิดโรคกับพืช (plant pathogen), ซาโปรไฟท์ (saprophyte) และพอกิฟิไฟท์ (epiphytes) โดยเชื้อในกลุ่ม carotovora สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชทำให้พืชมีลักษณะอาการเน่าและ ส่วนเชื้อในกลุ่ม amylovora เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ทำให้เกิดลักษณะอาการแห้งตาย (dry necrotic) หรือเหี่ยว (wilt) กับพืชอาศัย ส่วนเชื้อในกลุ่ม herbicola เป็นพอกิฟิไฟท์เกิดโรคกับพืชที่อ่อนแอ และเป็นซาโปรไฟท์ในดิน น้ำ และอากาศ (Beji et al., 1988) เชื้อในกลุ่ม carotovora ประกอบด้วย เชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca), *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc), และ *Erwinia chrysanthemi* (Ech) ทุก species ในกลุ่มนี้ให้ผลเป็นลบในปฏิกิริยา oxidase test แต่ให้ผล

เป็นบวกในปฏิกิริยา catalase test สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลชนิดอื่นๆ หลายชนิดแตกต่างกันไปแต่ละ species (Schaad *et al.*, 2001)

กลไกการทำลายพืชของเชื้อชนิดนี้คือ การสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยผนังเซลล์พืชทำให้เซลล์พืชหลุดสลาย และปลดปล่อยสารอาหารออกมา หลังจากนั้นเชื้อแบคทีเรียจะใช้สารอาหารเหล่านั้นในการเจริญเติบโต เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายเซลล์พืชมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น pectinase, cellulases และ proteases เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการเกิดโรคคือ pectinase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย pectin ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ primary cell wall และ middle lamella (Perombelon, 2002) เอนไซม์ pectinase ได้แก่ Pectate lyase (Pel), Pectin lyase (Pnl), Pectin methylesterase (Pme) และ Polygalacturonase (Peh) แต่ Pectate lyase เป็นเอนไซม์หลักที่ทำให้เกิดโรค (Collmer and Keen, 1986) เชื้อ soft rot *Erwinia* เข้าทำลายพืชโดยผ่านทางบาดแผล หรือช่องเปิดทางธรรมชาติ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะเกิดโรคกับพืช นอกจากนี้เชื้อยังมีการติดเชื้อแบบ latent infection ในหัวมันฝรั่งทำให้เกิดการแพร่กระจายเชื้อ และจะเข้าทำลายเมื่อพืชอ่อนแอ จึงเรียกได้ว่าเป็น opportunistic pathogens (Perombelon and Kelman, 1980) พืชอาศัยในกลุ่มเชื้อ *Erwinia* โดยเชื้อ Ecc เกิดโรคกับพืชได้หลายชนิด ส่วน Eca เกิดโรคกับมันฝรั่ง เนื่องจากว่ามีปัจจัยทางด้านนิเวศวิทยา ที่เอื้ออำนวยให้เชื้ออยู่รอดข้ามฤดู บนส่วนขยายพันธุ์ในแถบเขตร้อน ตรงกันข้ามกับ Ech ที่สามารถเกิดโรคในพืชหลายชนิดในเขตร้อน และเขตอบอุ่น สร้างความเสียหายให้แก่พืชปลูกในเขตร้อน โดยสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อเป็น biovars, serovar และ pathovar ได้หลายสายพันธุ์ เมื่อนำมาจัดกลุ่มแล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกัน จึงยากในการจัดแบ่งให้เชื้อจำเพาะกับพืชแต่ละชนิด (Young *et al.*, 1992) เชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้มีเฉพาะเชื้อ Eca และ Ech เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค black leg ในมันฝรั่ง แต่ว่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดสามารถทำให้เกิดโรคเน่าและในหัวมันฝรั่งได้ (Perombelon and Kelman, 1987)

5. ข้อมูลด้านอนุกรมวิธานของเชื้อ

ชื่อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*

ชื่อพ้อง *Erwinia stewartii*, *Xanthomonas stewartii*

ชื่อสามัญ Stewart's disease, Stewart's wilt, Stewart's bacterial wilt

6. การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อ

Domain Bacteria

Phylum Proteobacteria

Class γ -Proteobacteria

Order Enterobacteriales

Family Enterobacteriaceae

Genus *Pantoea*

Species *stewartii* (Mergaert *et al.*, 1993)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบข้อมูลคุณลักษณะของเชื้อ *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* และเชื้อใกล้เคียง

คุณลักษณะ/ การทดสอบ	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea ananas</i>
Motility	Non-motile	Motile	Motile	Motile
Gram staining	Negative	Negative	Negative	Negative
Cytochrome C oxidase	Negative	Negative	Negative	Negative
Catalase test	Positive	Positive	Positive	Positive
Esculin hydrolysis	Negative	Positive	Positive	Positive
Acetoin production	Negative	Positive	Positive	Positive
Indole production	Negative	Positive	Negative	Positive
Nitrate reduction	Negative	Negative	Positive	Variation
Growth on <i>cis</i> aconitate	Negative	Positive	Negative	Positive
Acid production from				
Maltose	Negative	Positive	Positive	Positive
Arbutin	Negative	Positive	Positive	Positive
Salicin	Negative	Positive	Positive	Positive
Raffinose	Positive	Positive	Negative	Positive
Cellobiose	Negative	Positive	Variation	Positive
Arabitol	Negative	Positive	Variation	Positive

หมายเหตุ Negative หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

Positive หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

Variation หมายถึง อาจให้ผลการทดสอบเป็นบวกหรือลบ

ที่มา: Mergaert *et al.* (1993)

รุ่งรัตน์ (2548) ได้พัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อตรวจหาเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. โดยพบว่าวิธีการ ELISA สามารถตรวจให้ผลความไวต่อเชื้อที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ระดับ 6×10^2 เซลล์/มิลลิตร อย่างไรก็ตามการทดสอบดังกล่าวใช้เชื้อบริสุทธิ์ และไม่ได้ทดสอบกับเชื้อในตัวอย่างธรรมชาติ ซึ่งอาจจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการตรวจจากตัวอย่างพืชลดลงได้ เนื่องจากในตัวอย่างธรรมชาติ อาจจะมีปัจจัยอื่นๆ มาเกี่ยวข้อง เช่น ปริมาณเชื้อมีน้อยจนไม่สามารถตรวจสอบได้ และสารในพืชที่มีผลต่อการตรวจ นอกจากการพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยา

Hauben *et al.* (1998) จัดจำแนกเชื้อ *E. carotovora* และ *E. chrysanthemi* ใหม่โดยศึกษา ลำดับเบสของ 16S rDNA สามารถจัดจำแนก และบอกความสัมพันธ์ระหว่าง species ในกลุ่มของ เชื้อ *Erwinia* จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อในสกุล *Erwinia* ควรจะแบ่งเป็น 4 สกุล คือ *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea* และ *Brenneria* ซึ่งในสกุล *Erwinia* มี 6 species ประกอบด้วย *E. amylovora*, *E. mallotivora*, *E. persicina*, *E. psidii*, *E. rhapontici* และ *E. tracheiphila* ส่วนสกุล *Pectobacterium* มี 4 species ประกอบด้วย *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. cacticida* และ *E. pyripedii* ส่วนสกุล *Brenneria* มี 6 species ประกอบด้วย *E. alni*, *E. nigrifluens*, *E. parodisiaca*, *E. quercina*, *E. rubrifaciens* และ *E. salicis* ส่วนสกุล *Pantoea* มี 5 species ประกอบด้วย *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. milletiae*, *E. stewartii* และ *E. uredovora* แม้ว่าชื่อของ *Pectobacterium* สามารถใช้แทนชื่อ *Erwinia* สาเหตุโรคเน่าและแล้วก็ตาม แต่นักโรคพืชที่ศึกษาเชื้อแบคทีเรียส่วน ใหญ่ยังไม่นิยมใช้ และอ้างอิงชื่อ *Erwinia* มากกว่า (Avrova *et al.*, 2002) และยังคงใช้การจัดจำแนก เชื้อในสกุล *Erwinia* โดยใช้ลักษณะ biochemical และ physiological (Schaad *et al.*, 2001)

ณัฐพร (2548) ศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Erwinia stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยว ของ ข้าวโพดในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia stewartii* (*Pantoea stewartii*) สาเหตุโรคเหี่ยว ของข้าวโพดจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) ของประเทศผู้ ตั้งซื้อเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากประเทศไทยโดยประเทศผู้ซื้อขอให้ ระบุข้อความในใบรับรองปลอด ศัตรูพืชว่าเมล็ดพันธุ์ต้องปราศจากเชื้อแบคทีเรีย ชนิดนี้ หรือเมล็ดพันธุ์ต้องได้มาจากแหล่งผลิตที่ ปราศจากเชื้อ *E. stewartii* จากการศึกษาในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเพื่อการส่งออกในระหว่าง ปี 2541-2544 (ฤดูผลิต 41/42 -44/45) จำนวน 331 แปลงเกษตรกรรมในพื้นที่ 269,288 ไร่ เก็บ ตัวอย่าง 503 ตัวอย่าง พบแบคทีเรีย 8 ไอโซเลตที่ทำให้เกิดโรคกับข้าวโพด เมื่อตรวจสอบทาง สรีรวิทยาพื้นฐานวิทยา ปฏิกริยาชีวเคมี ELISA การเจริญบนอาหาร Nigrosin และการตรวจสอบ ด้วยระบบ Biolog MT พบว่ามีแบคทีเรีย 2 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงเชื้อ *E. stewartii* ซึ่งแยก เชื้อได้จากดินที่ปลูกในแปลงทดลองเพื่อทดสอบสายพันธุ์สำหรับการส่ง ออกโดยใช้เมล็ดพันธุ์ที่

นำเข้าจากต่างประเทศในพื้นที่อำเภอสูงเม่น จังหวัดแพร่ และอำเภอแม่ระมาด จังหวัดตาก ซึ่งขณะนี้ ได้ถูกกำจัดและควบคุมโรคหมดสิ้นแล้ว

7. การพิสูจน์โรคตามวิธีของ Kach (Koch's Postulates)

Robert Koch นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน (คศ. 1843-1910) นำหลักเกณฑ์การพิสูจน์โรคทางแพทย์ของ Jacob Henle 4 ข้อ มาปฏิบัติและเผยแพร่จนเป็นที่นิยม และยังคงได้รับการยอมรับอยู่ในปัจจุบัน หลักเกณฑ์ทั้ง 4 ข้อนั้นได้แก่

1. Constant association of the pathogen and the host plant หมายถึง ส่วนที่แสดงอาการเป็นโรคอันเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ จะพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคในพืชนั้นเสมอ ไม่ว่าพืชนั้นจะปลูกอยู่ในท้องถิ่นใดก็ตาม เช่น โรคราน้ำค้างของข้าวโพด ไม่ว่าจะปลูกในจังหวัดนครราชสีมา ราชบุรีหรือที่อื่นๆ ส่วนที่แสดงลักษณะอาการของโรคจะมีเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคนิคมิตยกันอยู่เสมอ

2. Isolation in pure culture สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์จากส่วนของพืชที่เป็นโรคในข้อ 1 ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ด้วยวิธีต่างๆ เช่น tissue transplanting method dilution plate streak plant และอื่นๆ

3. Inoculation into the healthy host plant นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 2 ไปปลูกเชื้อ (inoculate) ลงบนต้นพืชชนิดเดียวกับข้อ 1 ที่ยังปกติและยังสมบูรณ์อยู่ พืชต้นหนึ่งก็ใช้เชื้อชนิดหนึ่ง ไม่ปะปนกัน เชื้อใดที่เป็นสาเหตุของโรคก็จะทำให้ต้นพืชนั้นแสดงลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏเหมือนกับอาการโรคที่พบในครั้งแรกในข้อ 1

4. Re-isolation and Re-inoculation แยกเชื้อจากต้นพืชที่แสดงอาการของโรคจากที่ทำไว้ในข้อ 3 ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่ง เพื่อนำไปปลูกเชื้อบนต้นพืชชนิดเดิมที่ปกติสมบูรณ์อีกต้นหนึ่ง เพื่อเป็นการเปรียบเทียบและยืนยันผลปฏิบัติการ ถ้าลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นเหมือนกับลักษณะอาการของโรคในข้อ 3 และที่เกิดขึ้นเองในข้อ 1 จึงสรุปได้ว่าเชื้อนั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคที่แท้จริง

8. การเตรียมดีเอ็นเอจากเซลล์

การเตรียมดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จากพืชหรือสัตว์ชั้นสูง เตรียมได้จากหลายแหล่ง วิธีพิจารณาว่าจะเตรียมจากส่วนไหนนั้นให้เลือจากสิ่งที่หาได้ และใช้วิธีที่ง่ายเป็นหลัก ในสมัยก่อนนิยมแยกส่วนของนิวเคลียสออกจากเซลล์ก่อน แล้วจึงนำมาเตรียมดีเอ็นเอ แต่ปัจจุบันไม่ค่อยทำ เนื่องจากพบว่าดีเอ็นเอจากไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ ไม่ได้ทำให้เกิดปัญหาในการโคลนนิ่งแต่อย่างใด รวมทั้งอาร์เอ็นเอที่ปะปนอยู่บ้างก็ไม่มีผลต่อการห่อหุ้มดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือเอนไซม์อื่นๆที่ใช้ สิ่งสำคัญคือการเตรียมดีเอ็นเอให้มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ เพื่อเหมาะในการนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และโคลนนิ่ง (สุรินทร์, 2536)

หลักการเตรียมดีเอ็นเอ นำเซลล์มาทำให้แตกเพื่อสกัดดีเอ็นเอที่อยู่ภายใน โดยใช้สารประกอบพวกดีเทอร์เจนท์ (detergent) เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) ร่วมกับเอนไซม์ proteinase K หลังจากนั้นจึงสกัดโปรตีนและเศษเซลล์ออกด้วยสารละลายฟีนอล แล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ (ethanol หรือ isopropanol) และอาจทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้นโดยนำไปปั่นเหวี่ยง ให้สมดุลในสารละลายซีเซียมคลอไรด์ และเอธิเดียมโบรไมด์ เมื่อได้ดีเอ็นเอแล้วจึงนำไปตรวจสอบขนาดโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส และหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ส่วนการเตรียมดีเอ็นเอจากพืช เตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ใบ กิ่ง ใบเลี้ยง ต้นอ่อน และกลุ่มเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (callus) นำส่วนของพืชนั้นมาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ในบัฟเฟอร์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ที่ประกอบด้วยสาร sodium dodecyl sulfate แล้วจึงเติมสาร โปแตสเซียมอะซิเตท ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดลงไปเพื่อให้ส่วนต่างๆ ของเซลล์พืชตกตะกอน นำส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบน มาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้แอลกอฮอล์ และดำเนินการขั้นตอนต่อไปเช่นเดียวกับการเตรียมดีเอ็นเอจากเซลล์สัตว์ (สุรินทร์, 2536)

Benjamin *et al.* (1999) ใช้วิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) แยก DNA สำหรับพืช *Lesquerella* ที่มี polysaccharide สูง โดยนำใบสดของพืชบดด้วยไนโตรเจน และนำมาสกัดด้วย SDS extraction buffer ที่ประกอบด้วย 0.1 M Tris (pH 8) 0.05 M EDTA (pH 8) 0.1 M NaCl, 1% SDS, 0.01 M 2-mercaptoethanol และกำจัดสาร polysaccharide ด้วยการเติม potassium acetate เนื่องจาก polysaccharide สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์เช่น restriction endonuclease หรือ PCR จึงต้องกำจัดออก ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีบริสุทธิ์ และได้ปริมาณดีเอ็นเอที่สูง ด้วยการทดสอบจากปฏิกิริยาเอนไซม์เช่น restriction endonuclease หรือ PCR พบว่าปฏิกิริยาทั้ง 2 สามารถเกิดขึ้นได้จากดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983)

9. ความสำคัญของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR)

ในระยะแรกๆ จนถึงปลายปี ค.ศ. 1980 นั้น ถือได้ว่าการโคลนยีนเป็นวิธีเดียวที่จะทำให้ได้ยีนที่บริสุทธิ์ สำหรับนำไปใช้ศึกษาต่อไปได้ ต่อมา มีการค้นพบการเพิ่มจำนวนยีนในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) ทำให้วิธีการแยกยีนที่สนใจให้บริสุทธิ์ไม่ได้จำกัดอยู่เพียงการใช้วิธีการโคลนยีนเท่านั้น สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) นั้น ลำดับเบสบริเวณที่ต้องการบนสายดีเอ็นเอจะถูกคัดสำเนาครั้งแล้วครั้งเล่าทำให้เกิดสายดีเอ็นเอเพียงชนิดเดียวจำนวนมากมามหาศาล ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) จะต้องออกแบบสภาวะการทดลองเพื่อให้สายดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นมานั้นเป็นโมเลกุลดีเอ็นเอที่มียีนที่เราสนใจประกอบอยู่ ดังนั้นผลที่ได้จากปฏิกิริยาจึงคล้ายกับการโคลนยีน นั่นคือจะได้ยีนที่บริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวเท่านั้นจากยีนจำนวนมากมาที่ปะปนกันอยู่ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR) เป็นวิธีการที่ให้ผลรวดเร็ว ตลอดจนมีความซับซ้อนน้อยกว่าการโคลนยีน และเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้เป็นล้านๆ ชุด โดยเริ่มจากยีนเพียงหนึ่งโมเลกุลเท่านั้น เนื่องจากวิธีนี้มีความไว (sensitivity) ก่อนข้างสูงทำให้สามารถนำมาเพิ่มจำนวนยีนที่สนใจจากตัวอย่างที่เป็นเซลล์ ๆ เดียว (มณีวรรณ, 2554)

ชลลดา (2548) ได้ศึกษาการใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Erwinia* spp. สาเหตุโรคน้ำและของผักภายหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia* spp. ที่แยกได้จากผัก 10 ชนิดที่แสดงอาการเน่าและ ได้แก่ กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี ผักกาดขาว ผักกวางตุ้ง ผักปวยเล้ง แครอท หัวไชเท้า แตงกวา มะเขือเทศ และหน่อไม้ฝรั่ง ได้ถูกนำมาตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุโรคด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด primer Y ซึ่งออกแบบมาจาก conserved sequences ของยีน *pelB* และ *pel153* ของ *Erwinia carotovora* และสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน *pel* ของ *E. carotovora* ได้ขนาด 434 bp และ primer ADE ซึ่งออกแบบมาจาก conserved sequences ของยีน *pelA*, *pelD*, *pelE* ของ *Erwinia chrysanthemi* และสามารถเพิ่มชิ้นส่วนของยีน *pel* ของ *E. chrysanthemi* ได้ขนาด 420 bp พบว่ามีเพียงชุด primer Y ที่มีความจำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์บนชิ้นส่วน DNA ของ *Erwinia* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกๆ ผลผลิต PCR จากชุด primer Y ที่ตรวจสอบได้มี similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *pel* ของ *E. carotovora* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Erwinia* spp. ที่แยกได้จากผักปวยเล้งและกะหล่ำดอก มี similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *pelB* ของ *E. carotovora* เท่ากับ 90 และ 94% สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Erwinia* spp. ที่แยกได้จากผักชนิดอื่น ๆ มี similarity กับลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *pel153* ของ *E. carotovora* อยู่ในช่วง 90-96% ผลการศึกษา การจัดจำแนกกลุ่มของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *pel* ของ *Erwinia*

spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ด้วย การวิเคราะห์ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Erwinia* spp. ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่แยกได้จากผักชนิดต่าง ๆ จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ *E. carotovora* การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคน้ำและและ ความรุนแรงของเชื้อ *E. carotovora* โดยการปลูกเชื้อลงบนผักกาดขาว พบว่าเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากผักทั้ง 10 ชนิด สามารถทำให้เกิดโรคน้ำและบนกาบ ผักกาดขาวได้แต่มีระดับความรุนแรงของการเกิดโรคแตกต่างกัน โดยเชื้อ *E. carotovora* สายพันธุ์ที่แยกได้จากแครอทสามารถทำให้เกิดโรคน้ำและได้รุนแรงที่สุด และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ pectate lyase, polygalacturonase, cellulase และ protease โดยวิธี spectrophotometer และวิธี cup plate พบว่าเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากผักต่างชนิดกัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ ชนิดต่าง ๆ แตกต่างกัน โดยเชื้อ *E. carotovora* ที่แยกได้จากแครอทมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด สูงที่สุด

นิโลบล (2548) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบยีน *pel* ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. ทั้งที่เป็นสาเหตุโรคน้ำและตายในขุ่น และสาเหตุโรคน้ำและในผัก และพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างธรรมชาติ พบว่า การเตรียมตัวอย่างตรวจควรทำการเจือจางน้ำคั้นที่เตรียมได้ในอาหารเหลว PE-PGA อาหารเหลวที่เติม polygalacturonic acid) ก่อนนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อให้มากขึ้น และทำให้มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. เนื่องจากในชั้นขุ่นมีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ และสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR โดยวิธีการที่เหมาะสมที่สุดคือแยกเชื้อจากชั้นพีช 1 กรัม ด้วยน้ำนิ่งมาเชื้อ 9 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดน้ำที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตร ไปเจือจางในอาหารเหลว PE-PGA ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกเชื้อสาเหตุได้มากที่สุด 107 CFU/มิลลิลิตร และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโน ของยีน *pel* ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. สาเหตุโรคน้ำและตายของขุ่นเหมือนกับ *pelC* ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. สาเหตุโรคน้ำและผัก

10. การโคลนยีน (gene cloning)

การโคลนยีนเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของยีนหรือดีเอ็นเอจำเพาะที่เราสนใจ โดยอาศัยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่มียีนหรือดีเอ็นเอที่เราสนใจนั้นๆ ในทางปฏิบัติการโคลนยีนต้องดำเนินการหลายขั้นตอนโดยใช้เทคนิคและความรู้ทางชีวเคมี และในแต่ละขั้นตอนจะต้องเตรียมองค์ประกอบต่างๆ ที่จะใช้ให้พร้อม โดยปกติเมื่อต้องการโคลนดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจจะต้องทำการตัดโมเลกุลดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่ให้ได้เป็นชิ้นที่มีขนาดตามต้องการ เครื่องมือที่ใช้ทำการตัดนั้นจะทำให้เกิดดีเอ็นเอขนาดต่างๆ มากมายแตกต่างกันซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยตรง แต่จะใช้แบคทีเรียซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวเพื่อทำการแยกดีเอ็นเอชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากการตัดดังกล่าว แบคทีเรียจำนวนล้านๆ เซลล์จะถูกนำมาผสมกับชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดแล้วใช้วิธีการที่ทำให้ดีเอ็นเอสามารถผ่านเข้าไปอยู่ในเซลล์ และดำรงอยู่อย่างถาวรภายในเซลล์แบคทีเรียได้ นอกจากนั้นยังต้องทำการปรับสภาวะเพื่อให้แบคทีเรียเซลล์หนึ่งสามารถรับเอาดีเอ็นเอเพียงชนิดเดียวเข้าไปภายในเซลล์เท่านั้น หลังจากนั้น เมื่อนำเอาแบคทีเรียไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จะทำให้เกิดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็นกลุ่มของเซลล์ ต่อจากนั้น นักวิจัยจะต้องทำการคัดกรอง และเลือกเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่มียีนหรือดีเอ็นเอที่สนใจเท่านั้น แล้วนำเอาแบคทีเรียดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนหลายๆ ครั้ง เพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากพอที่จะนำมาสกัดแยกเอาดีเอ็นเอหรือยีนที่สนใจออกมาศึกษาต่อไป (มณีวรรณ, 2554)

11. การตรวจสอบเชื้อก่อโรคโดยใช้วิธี Dot blot hybridization

Dot blot hybridization เป็นเทคนิคที่เหมาะสมกับการตรวจตัวอย่างเป็นจำนวนมาก และมีขั้นตอนการปฏิบัติที่ไม่ยุ่งยาก (สุปราณี, 2553)

สุปราณี (2553) พัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อยให้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ โดยการพัฒนาคีเอ็นเอตัวตรวจที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โคลน PCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน 16S rRNA ที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย จำนวน 4 ชุด และคัดเลือกโคลนที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพ โดยการทดสอบกับตัวอย่างใบอ้อย และตัวอย่างแมลง ด้วยวิธีการตัดเฉพาะส่วน ยีนที่ต้องการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* และติดฉลากด้วย digoxigenin นำมาตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Dot blot hybridization พบว่าโคลนจากไพร

เมอร์ A1A2 ให้สัญญาณที่ชัดเจนมากที่สุด และพบสัญญาณบนตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรค แต่ไม่พบในอ้อยที่ปกติ

Yan *et al.* (2007) ได้พัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อโรคเหลืองเดี่ยวในข้าวบาร์เลย์ในประเทศจีน สายพันธุ์ ไวรัสที่ก่อโรคมะ GAV, GPV, และ PAV จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อเชื้อไวรัส GAV, GPV, และ PAV ทำการสกัด RNA จากใบที่ติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดยใช้วิธีของ Trizol reagent และทำ RT-PCR amplification เมื่อได้ cDNA นำไปโคลนโดยใช้พลาสมิด pGEM-T และถ่ายเชื้อเข้าไปใน *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM110 นำมาสกัด plasmid และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ คัดลอก cDNA ด้วย digoxigenin (DIG) ที่จำเพาะเจาะจงในแต่ละสายพันธุ์ที่ได้จากการทำ RT-PCR amplification โดยนำโคลนมาเป็นตัวตรวจ และตรวจสอบเชื้อโดยใช้เทคนิค Dot-blot hybridization assay พบว่าเกิดสัญญาณในตัวอย่างของข้าวบาร์เลย์ ที่ติดเชื้อไวรัส GAV, GPV, และ PAV ทั้ง 3 สายพันธุ์อย่างชัดเจน แต่ไม่พบในข้าวบาร์เลย์ที่ปกติ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 Autoclave
- 1.2 หลอดทดลอง
- 1.3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- 1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.5 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) และเข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
- 1.6 ถุงพลาสติก, หนัวยยาง
- 1.7 Micropipette ขนาด P 1000 และ Tip ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 1.8 Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech)
- 1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Beckman GS-15R)
- 1.10 เครื่อง spectrophotometer (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 2.1 Endo agar
- 2.2 Nutrient glucose agar
- 2.3 ไนโตรเจนเหลว
- 2.4 70% Ethanol
- 2.5 20% SDS
- 2.6 5M Potassium acetate
- 2.7 Iso-propanol
- 2.8 TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA)
- 2.9 TE buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA)
- 2.10 Purelink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen)
- 2.11 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I

วิธีการ

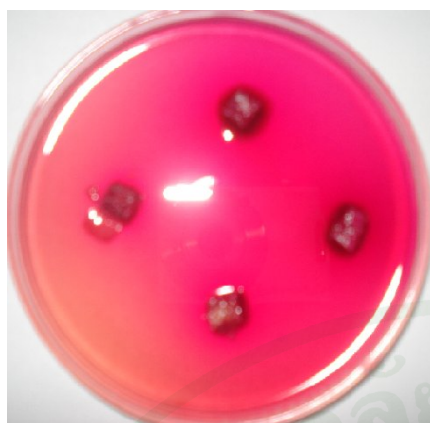
1. การแยกเชื้อและพิสูจน์โรคผลแกนในลำประด

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

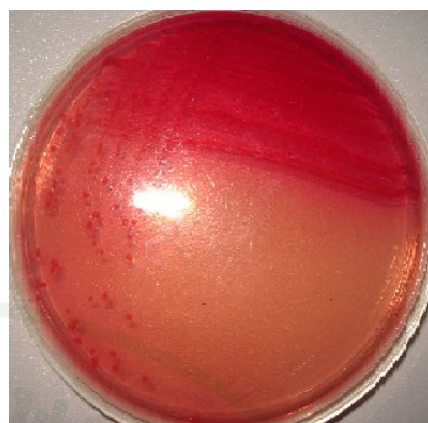
เก็บตัวอย่างเนื้อผลลำประดที่ไม่ผ่านการคัดเพื่อนำไปแปรรูปเนื่องจากแสดงอาการของโรคผลแกน 30 ตัวอย่าง และสุ่มเก็บตัวอย่างลำประดที่ผลไม่สุก และผลที่สุก อย่างละ 30 ตัวอย่าง โดยเลือกเก็บทุกส่วนของต้นเช่น ใบ ผล จุก หน่อ เนื่องจากโรคนี้ไม่แสดงอาการจากผลภายนอก และตัวอย่างดินจากแปลงปลูกลำประด จากทั้งหมด 12 แปลง แปลงละ 3 ซ้ำ จากบริษัท กุญบุรีผลไม้กระป๋อง อ.กุญบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์

1.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

ทำโดยวิธี Tissue transplanting method ตัดชิ้นพืชส่วนบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อที่ดีกับเนื้อเยื่อที่เป็นโรคผลแกนออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 5 x 5 มิลลิเมตร ด้วยใบมีดที่ลนไฟฆ่าเชื้อ จากนั้นนำชิ้นพืช ไปวางบนอาหารในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Endo agar ที่เหมาะสมจานละ 4 ชิ้น บ่มเชื้อประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว แตะโคโลนีที่เจริญออกมาจากชิ้นพืช Cross streak บนอาหาร NGA (Nutrient glucose agar) และ Endo agar บ่มเชื้อประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เลือกโคโลนีเดี่ยว ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน ที่เจริญบนอาหาร NGA (Nutrient glucose agar) และโคโลนีที่มีลักษณะสีแดง เข้มกลมนูน ขอบเรียบ และเหลือบแสง (metallic sheen) บนอาหาร Endo agar จากนั้นเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์แต่ละชนิดที่แยกได้ ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้เป็น stock และทดสอบต่อไป



2A



2B

ภาพที่ 2 วิธีการการแยกเชื้อบริสุทธิ์ 2A วิธี Tissue transplanting method และ 2B วิธี Cross streak

1.3 การพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch's Postulates)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้นำมาเตรียมเป็น suspension ในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อวัดค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร และปรับค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 1 ทำความสะอาดผลสับประดด้วย Alcohol 70% เช็ดด้วยผ้าสะอาด รอให้แห้ง แล้วทำบาดแผลสับประดด้วยใบมีดที่ทนไฟฆ่าเชื้อ ตัดสับประดเป็นแผ่นสี่เหลี่ยม ขนาด 0.5 x 0.5 ซม. จำนวน 3 แผ่น ต่อ สับประด 1 ผล คูด suspension ของเชื้อ และคูดน้ำกลั่นที่ไม่มีเชื้อ (Control) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปปลูกเชื้อ(Inoculate) ลงบนแผลสับประดที่ทำไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง แล้วตรวจผลทุก ๆ 3 วัน เป็นเวลา 9 วัน เพื่อดูการเกิดอาการของโรคผลแกน

1.4 การจำแนกเชื้อก่อโรคผลแกน

การวิเคราะห์เพื่อจำแนกเชื้อสาเหตุโรคเบื้องต้นทำโดยการย้อมสีแบบแกรมโดยใช้วิธีของ Hans Christian Gram ทำโดยนำเชื้อบริสุทธิ์มา smear ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด ทิ้งให้แห้ง จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยการผ่านเปลวไฟเร็วๆ 2-3 ครั้ง หยด Ammonium oxalate crystal violet ให้ท่วมรอย smear นานประมาณ 1 - 2 นาที แล้วเทสีทิ้ง หยดสารละลายไอโอไดน์ตามลงไปนานประมาณ 2 นาที แล้วเททิ้ง สารละลายไอโอไดน์เป็น mordant จะช่วยให้เซลล์ย้อมติดสีได้ดีขึ้น จากนั้นนำล้างสี decolorized ด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95% นาน 30 วินาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษซับ หยดสี Safranin-O ให้ท่วมเชื่อนานประมาณ 15-30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษซับ นำกระจกสไลด์มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ตรวจดูการติดสี นำเชื้อที่ติดสีแดงของ Safranin-O ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อแกรม negative มาทดสอบกับ

สารละลาย 3% KOH ถ้ายึดเหนี่ยวแสดงว่าเป็นแกรม negative ตรงกัน จึงส่งวิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคเนื้อเยื่อในตับประวัติด้วยเครื่อง BioLog system ที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตับประวัติ

สกัดดีเอ็นเอจาก ใบ เนื้อผล จุก หน่อ ของตับประวัติ ทั้งที่แสดงอาการ โรคผลแกน และปกติ โดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Dellaporta *et al.*, (1983) ซึ่งส่วนของตับประวัติที่ใช้สกัดประมาณ 1 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลว สกัดด้วย Extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2-mercaptoethanol) เติม 50 ไมโครลิตร 20% SDS เขย่าให้เข้ากันนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 2 นาที เติม 150 ไมโครลิตร 5M Potassium acetate นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายส่วนใสใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 1 เท่า iso-propanol ทำการผสมโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) นาน 10 นาที คว่ำหลอดเพื่อให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ปริมาตร 440 ไมโครลิตร เติม 3 M Sodium acetate ปริมาตร 45 ไมโครลิตร และเติม Absolute ethanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 8-10 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) นาน 10 นาที คว่ำหลอดเพื่อให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วย 50 ไมโครลิตร TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA) เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรีย และตัวอย่างดิน

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว NGB (Nutrient glucose broth) ปริมาณ 5 ml เชื้อที่ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ใส่หลอด centrifuge ปริมาณ 1.4 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ถ้าสกัดดีเอ็นเอดินใช้ 0.5 กรัม) เติม TE buffer 400 ไมโครลิตร บนตะกอนเซลล์ นำมาสกัดตามวิธีของ Rakhi Agrawal *et al.*, (2009) โดยเติม 10% SDS ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ Proteinase K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 56 องศาเซลเซียส 45 นาที จากนั้นเติม phenol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนมาเติมด้วย phenol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 10 นาที ทำในขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง นำส่วนใสด้านบนมาเติมด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ทำในขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง และนำส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า ของปริมาณส่วนใสที่ดูตามา บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 30 นาที อุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส ทิ้งส่วนใสด้านบน และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบน และตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

วัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอจากตัวอย่างสับปะรดปกติ และสับปะรดที่เป็นโรคน้ำแฉก โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) ในหลอดทดลอง ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมน้ำปริมาตร 398 ไมโครลิตร และตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอบน 1 % Agarose gel ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 40 นาที

4. การทำปฏิกิริยาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูลใน Gen Bank (16S ribosomal RNA *Erwinia stewartii*) Accession no. NR_026045 (Kwon *et al.*, 1997) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10x PCR buffer, 25 mM dNTP, 10 μ M forward primer Sequence 5'-AGG CCT TCG GGT TGT AAA GT-3', 10 μ M reverse primer Sequence 5'-CGG GGA TTT CAC ATC TGA CT-3', 5 U/ μ l *Taq* DNA polymerase และเติมน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื่อมจนครบปริมาตรที่ต้องการ ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างสับปะรดปกติ สับปะรดที่เป็นโรคผลแกน และเชื้อที่ก่อโรคผลแกนในสับปะรด เข้มข้น 500 นาโนกรัม นำมาเพิ่มปริมาณด้วยเครื่อง Thermal cycle Model 2400 (Perkin Elmer) ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 30 รอบ ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

วิเคราะห์ผลที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Horizontal electrophoresis GNA 100 (Pharmacia Biotech) โดยการทำให้ gel electrophoresis บน 1.5 % Agarose gel ใช้กระแสไฟฟ้า 100 Voltage นาน 60 นาที

5. การโคลนยีน

5.1 Gene Clean

ทำให้ชิ้น PCR product บริสุทธิ์ด้วย Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) ชั่งน้ำหนักเจลดีเอ็นเอ เติม Gel solubilization buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจลดีเอ็นเอ นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม iso-propanol ปริมาตรเท่ากับ Gel solubilization buffer เขย่าเบาๆ คูณใส่ column ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เป็นเวลา 1 นาที เติม Wash buffer 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เป็นเวลา 3 นาที ทำ 2 ครั้ง นำ column ใส่ tube เติม Elution buffer 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เป็นเวลา 1 นาที เอา column ทิ้งไป ได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

5.2 Ligation

ผสม 2x buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร PCR Product ที่ purified แล้ว ปริมาตร 6 ไมโครลิตร pGEM-T ปริมาตร 1 ไมโครลิตร T₄ DNA 1 ไมโครลิตร H₂O 2 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3 Transformation of Competent *E. coli*

ใช้ Competent *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับตัวอย่างที่ทำ Ligation ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มในน้ำแข็ง เวลา 30 นาที จากนั้นทำ Heat shock ใน Water bath ที่ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที และแช่น้ำแข็ง 5 นาที เลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าที่ 250 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม LB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำมา Spread Plate

5.4 การเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร LA/ampicillin agar plate เมื่ออาหารแห้ง เติม 100 mM IPTG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 50 mg/ml X – Gal ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร LA/ampicillin agar plate แล้ว Spread Plate ให้สารซึมเข้าสู่อาหาร ประมาณ 30 นาที ก่อนใช้งาน จากนั้น Spread Plate ด้วย recombinant cell 100 ไมโครลิตร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง เลือก โคโลนีสีขาว เลี้ยงใน Flask อาหารเหลว LB 5 มิลลิลิตร ที่เติม Ampicillin 5 ไมโครลิตร เขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 16 ชั่วโมง นำมาสกัด plasmid

6. สกัด Plasmids

นำอาหารที่เลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม solution ที่ 1 (0.4% Lysozyme (w/v), 50 mM Glucose, 25 mM tris – HCl pH 8.0 และ 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม solution ที่ 2 (0.2 M NaOH และ 1% SDS) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และเติม solution ที่ 3 (3M Potassium acetate และ 0.2 M Glacial acetic acid) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็ง 5 นาที เติม Phenol :

Chloroform 1 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 350 ไมโครลิตร เติมน้ำ iso – propanol ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำ 70% Ethanol ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที (Beckman GS-15R) เวลา 7 นาที ทำตะกอนให้แห้ง เติมน้ำ H₂O 50 ไมโครลิตร เติมน้ำ Rnase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel Electrophoresis

7. Restriction endonuclease digestion

นำตัวอย่าง plasmids ที่สกัดได้ วิเคราะห์โดย restriction digestion โดยใช้ *EcoRI* ของ (Fermentas) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel Electrophoresis

8. Dot-blot hybridization

8.1 การเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจ

ตัดเฉพาะส่วนดีเอ็นเอที่ถูกแทรกจากการโคลนด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* นำมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) นำดีเอ็นเอที่ได้มาติดฉลากเพื่อสร้างดีเอ็นเอตัวตรวจ ด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) โดยเติม 12 µl Template DNA และน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 16 µl นำมาต้มในน้ำเดือด 10 นาที และบ่มในน้ำแข็งทันที แล้วผสม DIG-High Prime 4 µl และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M EDTA และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

8.2 การทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชัน

นำตัวอย่างดีเอ็นเอจาก ส่วนต่างๆของสับปะรด และตัวอย่างดิน ที่สกัดด้วยวิธี Dellaporta *et al.* (1983) และ Rakhi Agrawal *et al.* (2009) ตามลำดับ ความเข้มข้น 2 µg/µl มาหยดบนกระดาษ nylon membrane ที่แช่ใน 10X SSC ก่อนที่จะหยดตัวอย่าง เมื่อแห้งแล้วบ่มใน UV stratalinker 1800 (Stratalinker gene) ที่กำลังงาน 1200 KJ นาน 10 นาที แล้วนำ membrane ไปถูกร้อนเติม Pre-hybridization ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในเครื่อง Hybridization oven / Shaker SI 20H

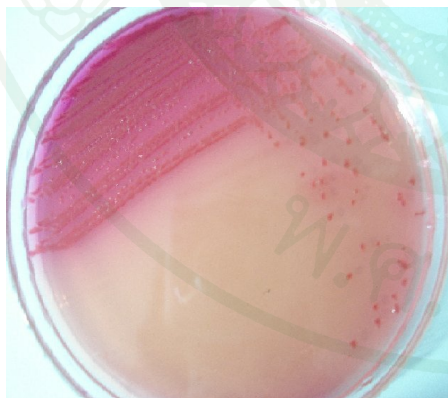
(Stuart scientific) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อใกล้ครบเวลา นำดีเอ็นเอตัวตรวจที่เตรียมไว้ต้มในน้ำเดือด 10 นาที และบ่มในน้ำแข็งทันที ดูดสารละลายใส่ใน 10 มิลลิลิตร ของ Hybridization granule แล้วเติมใส่ในถุงร้อนแทน Pre-hybridization ที่เทออก บ่มในเครื่อง Hybridization oven / Shaker SI 20H (Stuart scientific) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่น membrane ด้วยสารละลาย Post-Hybridization solution I (2X SSC และ 0.1% SDS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และสารละลาย Post-Hybridization solution II (0.5X SSC และ 0.1% SDS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ล้างแผ่น membrane ด้วย washing buffer (0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl pH 7.5 และ 0.3% (v/v) Tween 20) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมสารละลาย Blocking solution 10X Blocking solution : Maleic acid buffer [(0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl pH 7.5) = 1:10] ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตรต่อ membrane ขนาด 100 ตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เท Blocking solution ออก แล้วเติม Antibody solution [Anti-Digoxigenin-AP (150 mU) : Blocking solution = 1:5,000] ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างแผ่น membrane ด้วย washing buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทำ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที และเติม Detection solution (0.1M tris-HCl และ 0.1M NaCl pH 9.5) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลไฮบริไดเซชันด้วย Color-substrate solution (NBT/BCIP stock solution : Detection buffer = 200 μ l : 10 ml) เก็บไว้ในที่มีดจนกว่าสีจะปรากฏที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการสังเกตปฏิกิริยาการเกิดสัญญาณแถบสีม่วงน้ำเงิน หยุดปฏิกิริยา โดยแช่แผ่น membrane ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และฝังให้แห้งบนกระดาษ 3M บันทึกผลโดยการ scan ภาพจากเครื่อง HP Deskjet 2050 All-in-One Printer

ผลและวิจารณ์

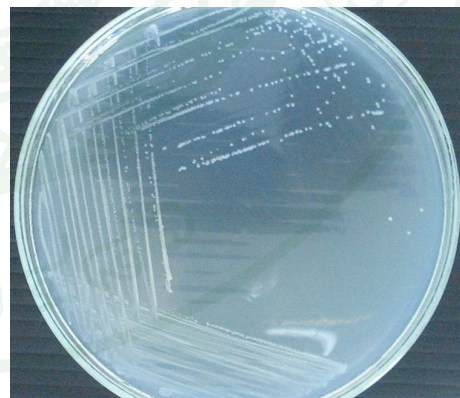
ผล

1. การแยกเชื้อและพิสูจน์โรคผลแกนในสับปะรด

การแยกเชื้อโดยวิธี Tissue transplanting method และ Cross streak บนอาหาร NGA (Nutrient glucose agar) และ Endo agar ได้เชื้อแบคทีเรียหลายลักษณะ เลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะ โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น และขาวอมเหลือง บนอาหาร NGA และโคโลนีสีแดงเข้ม กลมมน ผิวเรียบ และเหือบแสง metallic sheen บนอาหาร Endo agar ซึ่งคาดว่าเป็นลักษณะของเชื้อ *Pantoea (Erwinia) stewartii* สาเหตุของโรคผลแกน นำไปพิสูจน์โรคตามวิธีของ Koch (Koch's Postulates) พบว่าเชื้อมีลักษณะ โคโลนีสีขาวขุ่น บนอาหาร NGA และโคโลนีสีแดงเข้ม กลมมน ผิวเรียบ และเหือบแสง บนอาหาร Endo agar สามารถก่อให้เกิดโรคผลแกนในสับปะรด ได้ในเวลา 3 วัน หลังจากปลูกเชื้อ เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติ โดยย้อมสีแกรม และทดสอบกับ 3% KOH พบว่าเป็นเชื้อแกรมลบ (Gram negative) จึงส่งเชื้อไปส่งตรวจวิเคราะห์ เพื่อจำแนกชนิดด้วย Biolog system ผลปรากฏว่าตรงตามลักษณะของ *Pantoea (Erwinia) stewartii* ตรงกับที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคนี้



3A

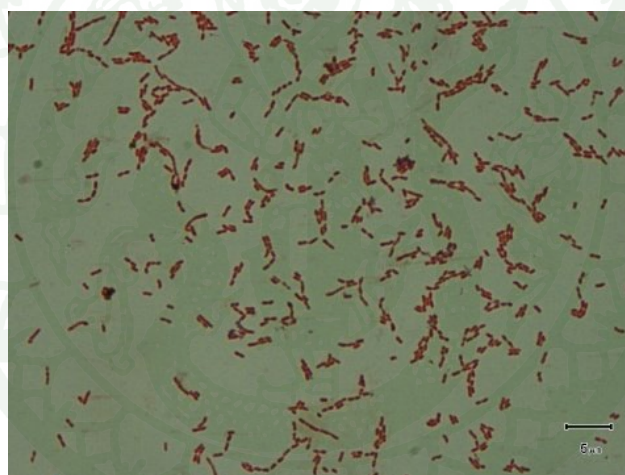


3B

ภาพที่ 3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากสับปะรดที่แสดงอาการโรคผลแกน อายุประมาณ 24-48 ชั่วโมง 3A บนอาหาร Endo agar โคโลนีสีแดงเข้ม กลมมน ผิวเรียบ และเหือบแสง และ 3B บนอาหาร NGA โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น และขาวอมเหลือง



ภาพที่ 4 การปลูกเชื้อ (Inoculate) ลงบนแผลสับประรดที่ทำไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เพื่อดูการเกิดอาการของโรคผลแกน 4A ปลูกเชื้อ 3 วัน เริ่มแสดงอาการของโรคผลแกน, 4B ปลูกเชื้อ 6 วัน แสดงอาการของโรคผลแกนชัดเจนขึ้น และ 4C ปลูกเชื้อ 9 วัน ลักษณะเนื้อสีน้ำตาลเข้ม แข็งเป็นไต และแสดงอาการชัดเจนที่สุด



ภาพที่ 5 การย้อมสีแกรมของเชื้อ *Pantoea (Erwinia) stewartii* พบว่าเป็นเชื้อแกรมลบ (Gram negative) เซลล์ติดสีแดงของ Safranin-O ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 3 ผลการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรททั้ง 95 ชนิด จาก GN2 MicroPlate™
(ภาพที่ 6) และอ่านผลด้วยเครื่อง Microlog™ System

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	{16}	2	5	15	1	0	{34}	<54>	<284>	{29}
B	<142>	<152>	0	0	1	<77>	<72>	4	0	0	<326>	{40}
C	0	-1	-4	-2	2	<56>	-1	-1	0	4	{33}	{26}
D	-2	-1	0	-2	-3	-2	{19}	5	1	1	{25}	{21}
E	-2	-2	1	2	7	0	0	-1	0	-2	0	6
F	-2	-2	1	-1	-1	-3	-1	-2	-2	-2	-2	3
G	-1	-2	-1	-2	-2	-1	-2	-1	-1	-1	-1	1
H	-1	1	-1	-1	0	-1	-1	1	<106>	-2	0	4

หมายเหตุ <X> คือ สามารถใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรทได้ (positive)

X คือ ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารสับสเตรทได้ (negative)

{X} คือ เป็นไปได้ทั้งสองอย่าง

-X คือ มีค่าน้อยกว่าตัวควบคุมที่ช่อง A1 (น้ำกลั่น)

A1 Water	A2 α -Cyclodextrin	A3 Dextrin	A4 Glycogen	A5 Tween 40	A6 Tween 80	A7 N-Acetyl-D-Galactosamine	A8 N-Acetyl-D-Glucosamine	A9 Adonitol	A10 L-Arabinose	A11 D-Arabitol	A12 D-Cellobiose
B1 i-Erythritol	B2 D-Fructose	B3 L-Fucose	B4 D-Galactose	B5 Gentiobiose	B6 α -D-Glucose	B7 m-Inositol	B8 α -D-Lactose	B9 Lactulose	B10 Maltose	B11 D-Mannitol	B12 D-Mannose
C1 D-Melibiose	C2 β -Methyl-D-Glucoside	C3 D-Psicose	C4 D-Raffinose	C5 L-Rhamnose	C6 D-Sorbitol	C7 Sucrose	C8 D-Trehalose	C9 Turannose	C10 Xylitol	C11 Pyruvic Acid Methyl Ester	C12 Succinic Acid Mono-Methyl-Ester
D1 Acetic Acid	D2 Cis-Aconitic Acid	D3 Citric Acid	D4 Formic Acid	D5 D-Galactonic Acid Lactone	D6 D-Galacturonic Acid	D7 D-Gluconic Acid	D8 D-Glucosaminic Acid	D9 D-Glucuronic Acid	D10 α -Hydroxybutyric Acid	D11 β -Hydroxybutyric Acid	D12 γ -Hydroxybutyric Acid
E1 p-Hydroxy Phenylacetic Acid	E2 Itaconic Acid	E3 α -Keto Butyric Acid	E4 α -Keto Glutaric Acid	E5 α -Keto Valeric Acid	E6 D,L-Lactic Acid	E7 Malonic Acid	E8 Propionic Acid	E9 Quinic Acid	E10 D-Saccharic Acid	E11 Sebacic Acid	E12 Succinic Acid
F1 Bromosuccinic Acid	F2 Succinamic Acid	F3 Glucuronamide	F4 L-Alaninamide	F5 D-Alanine	F6 L-Alanine	F7 L-Alanyl-glycine	F8 L-Asparagine	F9 L-Aspartic Acid	F10 L-Glutamic Acid	F11 Glycyl-L-Aspartic Acid	F12 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Histidine	G2 Hydroxy-L-Proline	G3 L-Leucine	G4 L-Ornithine	G5 L-Phenylalanine	G6 L-Proline	G7 L-Pyrogutamic Acid	G8 D-Serine	G9 L-Serine	G10 L-Threonine	G11 D,L-Carnitine	G12 γ -Amino Butyric Acid
H1 Urocanic Acid	H2 Inosine	H3 Uridine	H4 Thymidine	H5 Phenethyl-amine	H6 Putrescine	H7 2-Aminoethanol	H8 2,3-Butanediol	H9 Glycerol	H10 D,L- α -Glycerol Phosphate	H11 α -D-Glucose-1-Phosphate	H12 D-Glucose-6-Phosphate

ภาพที่ 6 แหล่งคาร์บอนในอาหาร GN2 MicroPlateTM ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์และจำแนกเชื้อกลุ่มแกรมลบ (Gram negative)

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์จำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง BioLog system โดยใช้ฐานข้อมูล MicroLog™

	Species	PROB	SIM	DIST	TYPE
1	<i>Pantoea stewartii ss stewartii</i>	82	0.54	5.25	GN-ENT
2	<i>Pantoea dispersa</i>	14	0.09	5.85	GN-ENT
3	<i>Serratia fonticola</i>	2	0.01	6.48	GN-ENT
4	<i>Yersinia kristensenii</i>	1	0.00	6.98	GN-ENT
5	<i>Serratia odorifera</i>	0	0.00	7.32	GN-ENT
6	<i>Yersinia intermedia</i>	0	0.00	7.39	GN-ENT
7	<i>Yersinia aldovae</i>	0	0.00	7.44	GN-ENT
8	<i>Serratia rubidaea</i>	0	0.00	7.50	GN-ENT
9	<i>Salmonella gp 3B (diarizonae)</i>	0	0.00	7.68	GN-ENT
10	<i>Yersinia fredericksonii</i>	0	0.00	7.83	GN-ENT

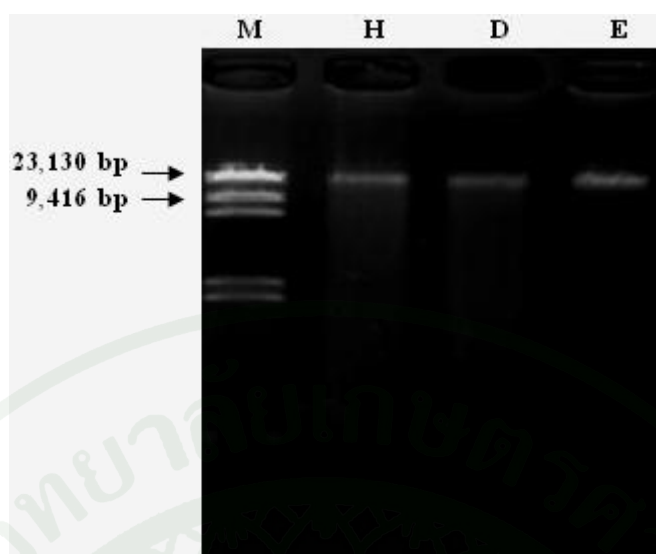
จากการวิเคราะห์โดยใช้ฐานข้อมูล MicroLog™ สามารถจำแนกได้เป็น *Pantoea stewartii ss stewartii* (*Erwinia stewartii*) ที่ 82 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรีย แกรมลบ (negative) มีรูปร่างแบบ short rod และมีผลเพิ่มเติมคือ Oxidase - Enteric

2. การสกัดดีเอ็นเอ

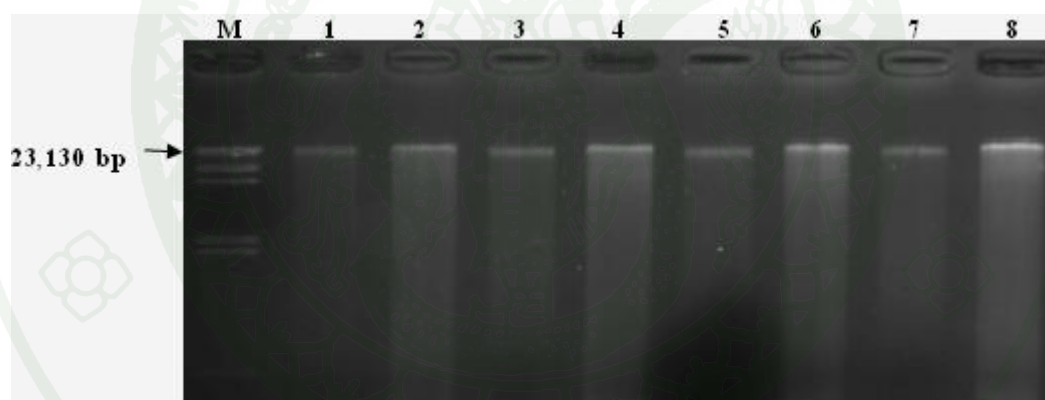
การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของสับปะรด โดยใช้วิธีของ Dellaporta *et al.*, (1983) เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอซึ่งให้คุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอในปริมาณเหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองทางชีวโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และขั้นตอนการทำไฮบริไดเซชัน เพราะสารเคมีที่ใช้ในการสกัดมีประสิทธิภาพสูง คือ Extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2-mercaptoethanol) และ SDS อีกทั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ คือ 65 องศาเซลเซียส

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Erwinia stewartii* โดยใช้วิธีการของ Rakhi Agrawal *et al.*, (2009) เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอซึ่งให้คุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอในปริมาณสูง ซึ่งวิธีการสกัดนี้มีการปรับลดการใช้สารเคมี โดยในขั้นตอนการสกัดจะใช้ TE buffer, SDS และ Proteinase K เท่านั้นในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia stewartii* ที่ 56 องศาเซลเซียส เนื่องจากถ้าใช้อุณหภูมิน้อยกว่านี้จะสกัดดีเอ็นเอของเชื้อซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ไม่ดี อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 56 – 65 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่สูงนี้จะทำลายผนังของแบคทีเรียแกรมลบ และวิธีการนี้ยังสามารถใช้สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia stewartii* จากตัวอย่างดิน จากแปลงปลูกสับปะรดได้ โดยวิธีการสกัดรวดเร็ว และไม่ต้องเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ก่อนที่จะนำมาสกัด จะใช้ตัวอย่างดินที่เก็บมาชั่ง 0.5 กรัม และนำมาสกัดได้ทันที ซึ่งวิธีการสกัดนี้ใช้ขั้นตอน และเวลาน้อย แต่คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองทางชีวโมเลกุลในขั้นตอนต่อไป เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และขั้นตอนการทำไฮบริไดเซชัน

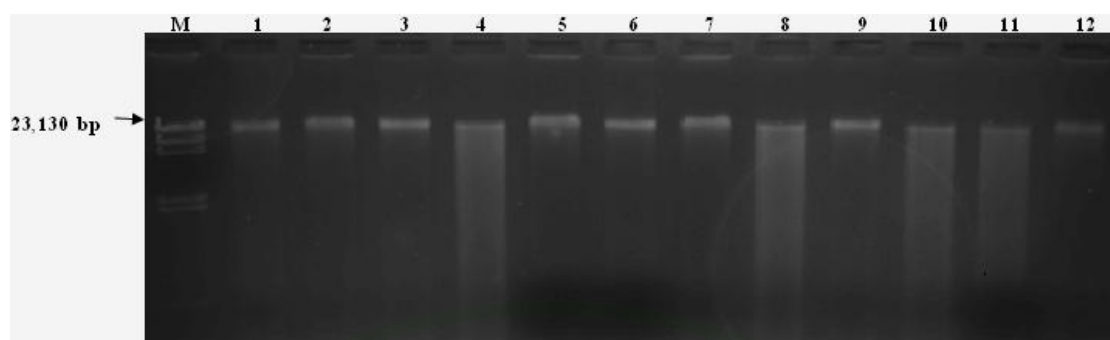
ลักษณะของ Genomic DNA บน Agarose gel ก่อนข้างสะอาด คมชัด การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} มีค่าเท่ากับ 1.77, 1.70 และ 1.89 ตามลำดับ แสดงให้เห็นคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอในปริมาณสูง



ภาพที่ 7 Genomic DNA บน 1 % Agarose gel โดยที่ M = Lambda DNA-*Hind III* Digest, H = สับปะรดที่ปกติ, D = สับปะรดที่เป็น โรคผลแกน และ E = เชื้อ *Erwinia stewartii*



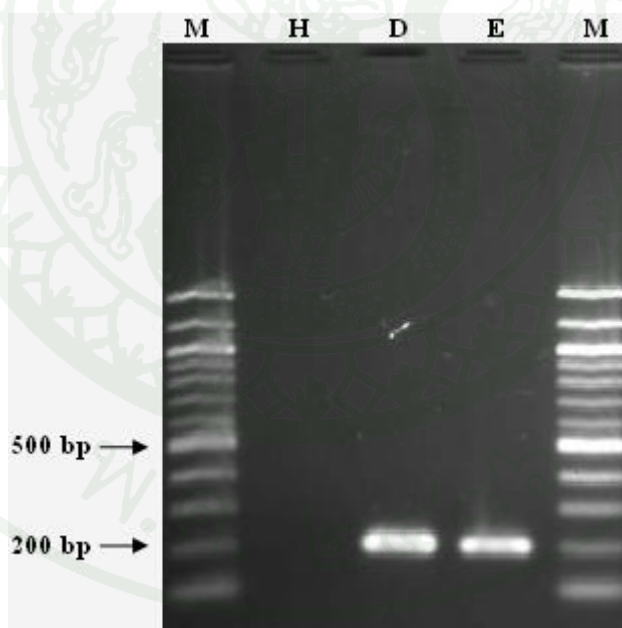
ภาพที่ 8 Genomic DNA ส่วนต่างๆ ของสับปะรด บน 1 % Agarose gel โดยที่ M = Lambda DNA-*Hind III* Digest, (1-4 = ผล, ใบ, จุก และหน่อ ที่ปกติตามลำดับ) และ (5-8 = ผล, ใบ, จุก และหน่อ ที่เป็น โรคผลแกนตามลำดับ)



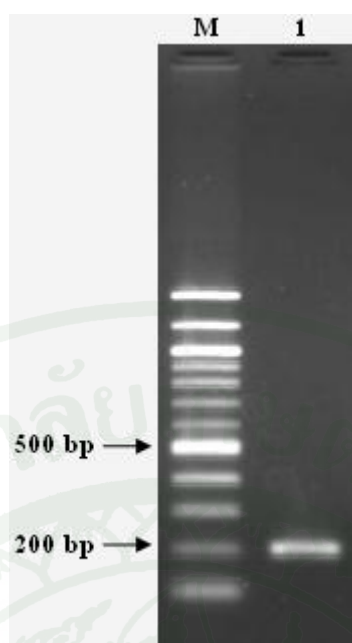
ภาพที่ 9 Genomic DNA ของตัวอย่างดิน บน 1 % Agarose gel โดยที่ M = Lambda DNA- *Hind III* Digest, 1-12 = ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างดินจากแปลงปลูกสับปะรดต่างๆ ที่จังหวัด ประจวบคีรีขันธ์

3. การทำปฏิกิริยาและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การศึกษาในครั้งนี้ ได้คัดเลือกดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ ศึกษาในส่วนของยีนอนุรักษ์ คือ 16S rRNA ซึ่งมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำคัญต่างๆ ของเชื้อ *Erwinia stewartii* ไว้ในฐานข้อมูลของ Gen Bank โปรแกรมที่ใช้ออกแบบมาจากส่วนของยีน 16S rRNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Erwinia stewartii* สาเหตุโรคผลแกนในสับปะรด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอของโรคผลแกนในสับปะรดคือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อสับปะรดที่แสดงอาการของโรคผลแกน และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Erwinia stewartii* มีขนาด 200 เบส และไม่พบแถบดีเอ็นเอของเนื้อผลสับปะรดที่ปลอดโรค การวิเคราะห์เชื้อนอกจากจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคผลแกนในสับปะรดด้วยเครื่อง BioLog system แล้ว ยังสามารถยืนยันเชื้อก่อโรคผลแกนได้จากเทคนิคพีซีอาร์ PCR product ที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) สำหรับใช้ในการโคลน เพื่อใช้วิเคราะห์ลำดับเบส และสร้างเป็นดีเอ็นเอตัวตรวจ



ภาพที่ 10 วิเคราะห์ PCR product บน 1.5 % Agarose gel โดยที่ M = 100 bp DNA Ladder,
H = สับปะรดที่ปกติ, D = สับปะรดที่เป็นโรคผลแกน และ E = เชื้อ *Erwinia stewartii*

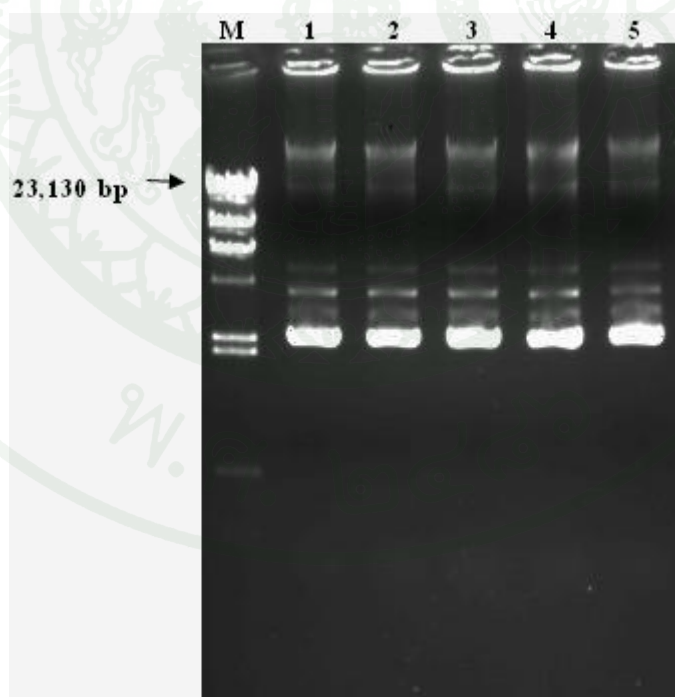


ภาพที่ 11 การนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) โดยที่ M = 100 bp DNA Ladder และ 1 = PCR product ที่ใช้ในการโคลน

4. การสกัด plasmids

โคลนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแถบดีเอ็นเอของเนื้อผลสับปะรดที่เป็นโรคผลแกน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับโรคเนื้อผลแกนในสับปะรด ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับตัวอย่างสับปะรดปกติ สับปะรดที่เป็นโรคแกน และตัวอย่างดินจากแปลงปลูกสับปะรด ซึ่งการโคลนขึ้นเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปศึกษาและวิเคราะห์ในขั้นต่อไป เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ การสร้างดีเอ็นเอตัวตรวจ เป็นต้น แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนนั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับคือ ดีเอ็นเอที่เป็นพาหะ หรือเวกเตอร์

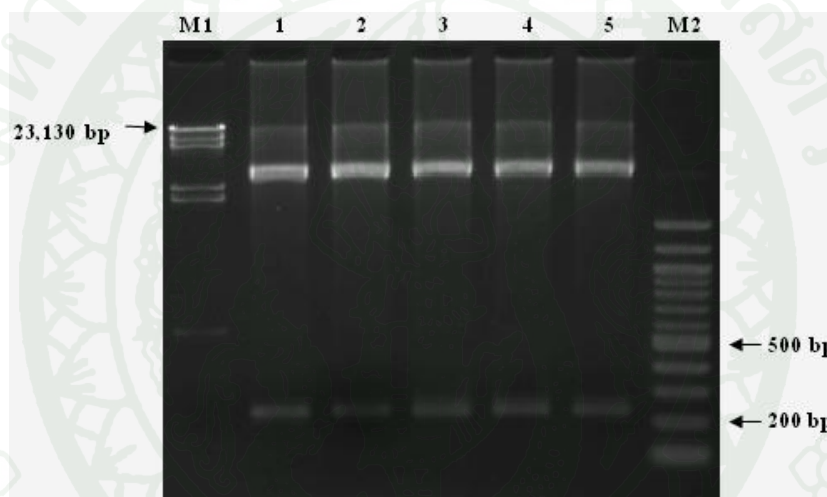
การผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ เพื่อใช้เป็นตัวตรวจในปฏิกิริยาไฮบริดเซชัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วทำการโคลนแถบดีเอ็นเอกับการใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นตัวตั้งต้นผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ พบว่าวิธีการนิยมมากที่สุดคือ การใช้โคลนผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ เนื่องจากมีปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจในปริมาณมาก



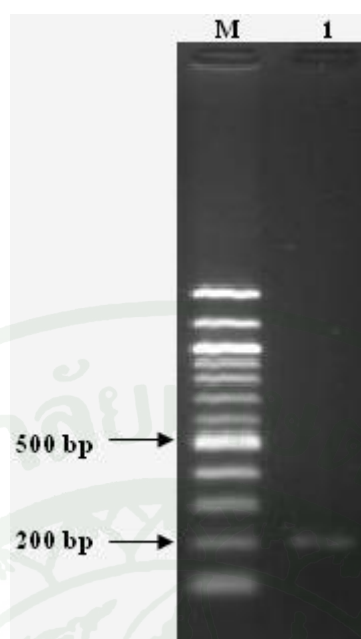
ภาพที่ 12 Genomic DNA การสกัด plasmids ทั้ง 5 ตัวอย่างโคลน ตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel โดยที่ M1 = Lambda DNA-*Hind III* Digest และ 1-5 = โคลนดีเอ็นเอ

5. Restriction endonuclease digestion

โคลนPCR product จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน 16S rRNA ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Erwinia stewartii* ของโรคผลแกนในสับปะรด ตัดเฉพาะส่วนดีเอ็นเอที่ถูกแทรกจากการโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* จะพบแถบของดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 200 bp จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Agarose gel Electrophoresis และตัดเจลส่วนของดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 200 bp มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen) และนำมาติดฉลากด้วย DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)



ภาพที่ 13 แสดง Restriction endonuclease digestion ของ Genomic DNA ที่ได้จากการสกัด plasmids ทั้ง 5 ตัวอย่างโคลนนิ่ง โดยใช้ *EcoRI* ในการตัด ตรวจสอบโดยใช้ 1% agarose gel โดยที่ M1 = Lambda DNA-*Hind III* Digest, M2 = 100 bp DNA Ladder และ 1-5 = โคลนดีเอ็นเอ



ภาพที่ 14 Inserted DNA มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด Purelink Quick Gel Extraction Kit (invitrogen)
โดยที่ M = 100 bp DNA Ladder และ 1 = Inserted DNA ที่ใช้ติดฉลากด้วย DIG-High
Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)

6. การวิเคราะห์ลำดับเบส

ลำดับของเบสที่วิเคราะห์ได้มีลำดับดังนี้

AGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTAA
TAACCTCATCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCA
CGCAGGCGGTCTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAATCGAATTCCCGCGGCCGCC
ATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA
CAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACT

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ฐานข้อมูลของ NCBI/ BLAST

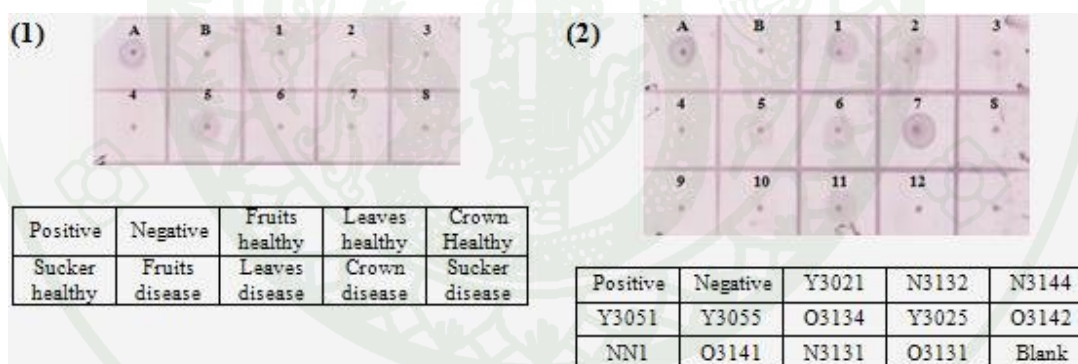
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
JQ659648.1	Pantoea stewartii strain R3-124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	368	368	64%	1e-98	99%
JQ660286.1	Pantoea stewartii strain S9-116 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	366	366	64%	4e-98	99%
JQ660111.1	Pantoea stewartii strain S3-113 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	366	366	64%	4e-98	99%
JQ660030.1	Pantoea stewartii strain S1-115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	366	366	64%	4e-98	99%

Pantoea stewartii strain R3-124 16S ribosomal RNA gene, partial sequence Length = 1455, Score = 368 bits (199), Expect = 1e-98 Identities = 200/201 (99%), Gaps = 0/201 (0%)

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสใช้ฐานข้อมูลของ NCBI/ BLAST พบว่าตรงกับเชื้อ *Pantoea stewartii* strain R3-124 หรือ *Erwinia stewartii* มากถึง 99%

7. Dot-blot hybridization

ตัวอย่างดีเอ็นเอจาก ส่วนต่างๆของสับปะรด และตัวอย่างดิน ที่สกัดด้วยวิธี Dellaporta *et al.* (1983) และ Rakhi Agrawal *et al.* (2009) นำมาทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอตัวตรวจ ผลการตรวจสอบจากเทคนิค Dot-blot hybridization พบว่าในส่วนของพืช แสดงผลเป็นบวก (positive result) เฉพาะในส่วนของเนื้อผลที่เป็นโรคเท่านั้น ส่วนของตัวอย่างดินในแต่ละแปลงปลูกสับปะรด พบว่าแปลง Y3021, N3132, N3144, Y3055, O3134, Y3025 และ N3131 แสดงผลเป็นบวก(positive result) และสามารถใช้วิธี Dot-blot hybridization ในการตรวจสอบหาเชื้อ *Erwinia stewartii* ได้ในตัวอย่างดินปลูกสับปะรด เพราะเชื้อ *Erwinia stewartii* เป็นแบคทีเรียจะก่อโรคเฉพาะที่เนื้อผลของสับปะรดเท่านั้น จึงไม่สามารถตรวจพบได้จากส่วนอื่น แต่ถ้าเป็นโรคที่เกิดจากไวรัส จะสามารถตรวจพบได้จากทุกส่วนของพืช เนื่องจากอาการที่เกิดจากไวรัสนั้น จะแพร่กระจายไปทุกส่วนของพืชได้



ภาพที่ 15 ผลการทำปฏิกิริยาไฮบริดเซชันด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจที่เฉพาะกับโรคเนื้อผลเน่า กับ ส่วนต่างๆของสับปะรด (1) และตัวอย่างดินที่ปลูกสับปะรด 12 แปลง ในจังหวัด ประจวบคีรีขันธ์ (2) โดยที่ A = โคลน และ B = น้ำกลั่น

วิจารณ์

การแยกเชื้อและพิสูจน์โรคผลแกนในสับปะรด พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เป็น เชื้อแกรมลบ ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA โคโลนีเล็ก สีขาวขุ่น และขาวอมเหลือง และลักษณะ โคโลนีบนอาหาร Endo agar โคโลนีสีแดงเข้ม กลมมน ผิวเรียบ และเหลือบแสง metallic sheen เมื่อนำไปจำแนกชนิดด้วย Biolog system พบว่าตรงตามลักษณะของ *Pantoea (Erwinia) stewartii* ซึ่งตรงกับที่มีรายงานว่าเป็นเชื้อสาเหตุของโรคนี้

การสกัดดีเอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของสับปะรด โดยใช้วิธีของ Dellaporta *et al.*, (1983) เป็น วิธีการสกัดดีเอ็นเอซึ่งให้คุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอในปริมาณที่สูง เพราะสารเคมีที่ใช้ในการ สกัดมีประสิทธิภาพสูง คือ Extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl และ 10 mM 2-mercaptoethanol) และ SDS อีกทั้งอุณหภูมิที่ใช้เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ คือ 65 องศาเซลเซียส คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองทางชีว โมเลกุลในขั้นตอนต่อไป เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และขั้นตอนการทำไฮบริ ไดเซชัน ซึ่งมีงานวิจัยของ Benjamin *et al.* (1999) ที่ใช้วิธีการของ Dellaporta *et al.* (1983) สกัด DNA จากพืช *Lesquerella* ที่มี polysaccharide สูง ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีบริสุทธิ์ และได้ปริมาณดี เอ็นเอที่สูง ด้วยการทดสอบจากปฏิกิริยาเอนไซม์เช่น restriction endonuclease หรือ PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Erwinia stewartii* ซึ่งเป็นเชื้อแกรมลบ โดยใช้วิธีการของ Rakhi Agrawal *et al.* (2009) ที่สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ *Rhizobium* ซึ่งเป็นเชื้อแกรมลบ ที่อยู่ในปมรากถั่วโดย ใช้วิธี Phenol Chloroform เป็นวิธีการสกัด และดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอใน ปริมาณสูง ซึ่งวิธีการสกัดนี้มีการปรับลดการใช้สารเคมี โดยในขั้นตอนการสกัดจะใช้ TE buffer, SDS และ Proteinase K เท่านั้นในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสกัด ดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia stewartii* ที่ 56 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 56 – 65 องศาเซลเซียสและวิธีการนี้ยังสามารถใช้สกัดดีเอ็นเอของเชื้อ *Erwinia stewartii* จากตัวอย่างดินจาก แปลงปลูกสับปะรด โดยวิธีการสกัดรวดเร็ว และไม่ต้องเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวก่อนที่จะนำมาสกัด จะใช้ตัวอย่างดินที่เก็บมาชั่ง 0.5 กรัม และนำมาสกัดได้ทันที ซึ่งวิธีการสกัดนี้ใช้ขั้นตอน และเวลาที่ น้อย แต่คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการทดลองทางชีวโมเลกุลใน ขั้นตอนต่อไป เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และขั้นตอนการทำไฮบริไดเซชัน

การศึกษาในครั้งนี้ ได้คัดเลือกดีเอ็นเอเป้าหมายที่สนใจ ศึกษาในส่วนของยีนอนุรักษ์ คือ 16S rRNA ซึ่งมีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนสำคัญต่างๆ ของเชื้อ *Erwinia stewartii* ไว้ในฐานข้อมูลของ Gen Bank โปรแกรมที่ใช้ออกแบบมาจากส่วนของยีน 16S rRNA ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ *Erwinia stewartii* สาเหตุเนื้อผลแกนในสับปะรด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอของโรคเนื้อผลแกนในสับปะรดคือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเนื้อผลแกน และดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อ *Erwinia stewartii* มีขนาด 200 เบส และไม่พบแถบดีเอ็นเอของเนื้อผลสับปะรดที่ปลอดโรค การวิเคราะห์ที่เชื่อมออกจากจำแนกชนิดของเชื้อก่อโรคเนื้อแกนในสับปะรดด้วยเครื่อง BioLog system แล้ว ยังสามารถยืนยันเชื้อก่อโรคผลแกนได้จากเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีงานวิจัยของ ชลลดา (2548) การใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Erwinia* spp. สาเหตุโรคเน่าและของผักภายหลังการเก็บเกี่ยว และนิโลบล (2548) ออกแบบโปรแกรมที่สามารถตรวจสอบยีน *pel* ของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. ทั้งที่เป็นสาเหตุโรคต้นแห้งตายในขนุน และสาเหตุโรคเน่าและในผัก ซึ่งวิธีนี้สามารถแยกเชื้อสาเหตุได้มากที่สุด 107 CFU/มิลลิลิตร และตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

โคลนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแถบดีเอ็นเอของเนื้อผลสับปะรดที่เป็นโรคผลแกน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจสำหรับโรคเนื้อผลแกนในสับปะรด ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาไฮบริดเซชันกับตัวอย่างสับปะรดปกติ สับปะรดที่เป็นโรคแกน และตัวอย่างดินจากแปลงปลูกสับปะรด ซึ่งการโคลนขึ้นเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปศึกษาและวิเคราะห์ในขั้นต่อไป เช่น การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ การสร้างดีเอ็นเอตัวตรวจ เป็นต้น แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนนั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวนโดยจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับ จึงต้องนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมาต่อเข้ากับดีเอ็นเออื่นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ผู้รับคือ ดีเอ็นเอที่เป็นพาหะ หรือเวกเตอร์ (สุรินทร์, 2539) ในการผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ เพื่อใช้เป็นตัวตรวจในปฏิกิริยาไฮบริดเซชัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วทำการโคลนแถบดีเอ็นเอกับการใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็นตัวตั้งต้นผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ พบว่าวิธีการนิยมมากที่สุดคือ การใช้โคลนผลิตดีเอ็นเอตัวตรวจ เนื่องจากมีปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้นที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอตัวตรวจในปริมาณมาก ผลการตรวจสอบจากเทคนิค Dot blot hybridization ในพืชพบว่า สามารถตรวจสอบโรคเนื้อผลแกนในสับปะรดได้จากส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อผลสับปะรดเท่านั้น และไม่พบในส่วนที่ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ใบ, จุก และหน่อของสับปะรด ซึ่งมีงานวิจัยของ Yan *et al.* (2007) ได้พัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อโรคเหลืองเฉียบในข้าวบาร์เลย์ในประเทศจีน ตัดคลาก cDNA ด้วย digoxigenin (DIG) และตรวจสอบเชื้อโดยใช้เทคนิค Dot-blot hybridization assay พบว่าเกิดสัญญาณในตัวอย่างของข้าวบาร์เลย์ ที่ติดเชื้อไวรัส GAV, GPV, และ

PAV ทั้ง 3 สายพันธุ์อย่างชัดเจน แต่ไม่พบในข้าวบาร์เลย์ที่ปกติ เทคนิคนี้ยังสามารถตรวจสอบเชื้อก่อโรคเนื่อผลแกนได้จากตัวอย่างดินแปลงปลูกสับปะรด เนื่องจากเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่ในดิน และมีไรแดงเป็นพาหะ ในการแพร่กระจายไปสู่ที่ต่างๆ และช่วยให้เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ผลได้ง่ายขึ้น (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

ประโยชน์ของการตรวจสอบในดินปลูกสับปะรด จะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคผลแกน และป้องกันการแพร่ระบาดของโรคผลแกนในสับปะรดได้ เมื่อตรวจสอบพบดินในแปลงปลูกมีเชื้อก่อโรคผลแกนในสับปะรด ทำการกำจัดเชื้อก่อโรคโดยใช้วิธีของ นันทิยา (2542) ใช้สารเคมีคลอโรพิกริน (Chloropicrin หรือ Tear Gas) คลอโรพิกรินเป็นของเหลว การใช้ต้องมีเครื่องฉีดสารในปริมาณ 5 มล/ลบ.ฟุตของดินขึ้นไป เมื่อฉีดแล้วควรให้น้ำบางๆ บนผิวดิน แล้วคลุมดินด้วยวัสดุที่ปิดให้แน่นทิ้งไว้ 3 วัน คลอโรพิกรินจะเปลี่ยนเป็นก๊าซซึมทั่วดิน หลังจากนั้นเปิดดินทิ้งไว้ 7-10 วัน จึงจะปลูกพืชได้ คลอโรพิกรินสามารถฆ่าไส้เดือนฝอย แมลง เมล็ดวัชพืชบางชนิด เชื้อราเวอร์ติซิลเลียม (Verticillium) แบคทีเรีย และเชื้อราส่วนมากที่มีความต้านทาน ไอของคลอโรพิกรินเป็นพิษมากกับเนื้อเยื่อ พืชที่มีชีวิต และอีกวิธีหนึ่งคือ วาแพม (Vapam) คือ โซเดียม เอ็น-เมทิล ไดไฮโอคาร์บาร์เมต ไดไฮโอเครด (Sodium N-methyl dithiocarbamate dehydrate) สามารถละลายน้ำได้ดีมีคุณสมบัติฆ่าพืชทั้งที่ยังไม่งอกและงอกแล้ว เชื้อราและแบคทีเรียในดินเกือบทุกชนิด และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถฆ่าไส้เดือนฝอยได้ด้วย สารนี้สลายตัวได้เร็วให้ก๊าซที่แทรกซึมได้ดีมาก การใช้ให้โรยบนดิน หรือผสมไปกับน้ำที่ไชรด หรือใช้เครื่องฉีดโดยเฉพาะสำหรับแปลงเพาะเมล็ด ให้ใช้วาแพมชนิดน้ำ 0.95 ลิตร ผสมน้ำ 7.6-11.6 ลิตร แล้วพรมบนพื้นที่ 9 ตร.ม. หลังจากให้วาแพมแล้วใช้ลูกกลิ้งกดทับให้แน่นๆ 3 สัปดาห์ต่อมาจึงปลูกพืชได้ วาแพมมีพิษน้อยต่อมนุษย์ แต่ก็ไม่ควรสูดกลิ่นของสารนี้เข้าไปและต้องระวังสารนี้กระเด็นถูกผิวหนัง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การแยกเชื้อและพิสูจน์โรค พบว่า *Pantoea (Erwinia) stewartii* เป็นเชื้อสาเหตุของโรคผลแกนในสับปะรด วิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Dellaporta และ Rakhi Agrawal เหมาะสมกับงานวิจัยนี้ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ และได้ปริมาณดีเอ็นเอที่สูง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน 16S rRNA ที่จำเพาะต่อ *Erwinia stewartii* เชื้อก่อโรคผลแกนในสับปะรด

เทคนิคพีซีอาร์สามารถใช้ยืนยันเชื้อ *Erwinia stewartii* ได้ โดย PCR product มีขนาดประมาณ 200 เบส ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสใช้ฐานข้อมูลของ NCBI/ BLAST พบว่าตรงกับเชื้อ *Pantoea stewartii* สายพันธุ์ R3-124 มากถึง 99% การติดฉลากที่ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย digoxigenin สามารถแสดงสัญญาณการเกิดสีได้ชัดเจน ดีเอ็นเอตัวตรวจที่ได้มีความไว และจำเพาะต่อเชื้อ *Pantoea stewartii* สาเหตุของโรคผลแกนในสับปะรด ดีเอ็นเอตัวตรวจสามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรคผลแกนได้ทั้งในผลสับปะรดและตัวอย่างดิน

โรคผลแกนในสับปะรด มีส่วนของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับโรคนี้ด้วย ในช่วงเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนตุลาคม ในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์นั้นจะมีสภาพอากาศร้อน สลับกับฝนในแต่ละวัน ทำให้เกิดการหดตัวและขยายตัวของผล จึงทำให้เกิดรอยแตกให้เชื้อแบคทีเรียเข้าสู่ผลสับปะรด โดยเฉพาะบริเวณตาสับปะรด ทำให้เกิดโรคเนื่อผลแกนขึ้นมา การสุ่มตรวจตัวอย่างดินก่อนปลูกสับปะรดด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจนี้จะช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคผลแกน และป้องกันการแพร่ระบาดของโรคผลแกนในสับปะรดได้ ถึงแม้สภาพอากาศจะเปลี่ยนแปลงมากเท่าใด ถ้าดินที่เพาะปลูกปลอดเชื้อก็จะเป็นการป้องกันการเกิดโรคผลแกนขึ้นมาได้

ข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยได้พัฒนาตัวตรวจที่มีคุณภาพสามารถตรวจง่าย รวดเร็ว และมีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อก่อโรคผลแกน เกษตรกรควรเก็บตัวอย่างดินที่จะปลูกมาตรวจก่อน ที่จะปลูก สับปะรด เพื่อลดความเสี่ยงของการเกิดโรคผลแกน และป้องกันการแพร่ระบาดของโรคผลแกนใน สับปะรดได้

การใช้สารเคมี แนะนำให้ใช้วาแพม (Vapam) หรือ โซเดียม เอ็น-เมทิล ไดไฮโอคาร์บาร์ เมด ไดไฮเดรต (Sodium N-methyl dithiocarbamate dehydrate) สามารถละลายน้ำได้ดี กำจัดเชื้อรา และแบคทีเรียในดินเกือบทุกชนิด สารนี้สลายตัวได้เร็วให้ก๊าซที่แทรกซึมได้ดีมาก และสารนี้มีพิษ น้อยต่อมนุษย์

เทคนิคการใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจสามารถประยุกต์ในการตรวจเชื้อสาเหตุโรคพืชอื่นๆได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมทรัพย์สินทางปัญญา. 2549. สับปรดภูแลเชียงราย-สับปรดนางแล. หน้า 1-12. ใน: หนังสือประกาศโฆษณาการรับลงทะเบียนสิ่งบ่งชี้ทางภูมิศาสตร์ ปีที่ 2 เล่มที่ 3.

กรมวิชาการเกษตร. 2545. เกษตรดีที่เหมาะสมกับสับปรด. เอกสารคำแนะนำเกษตรดีที่เหมาะสม ลำดับที่ 11. 30 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร. 2546. ศัตรูสับปรด. เอกสารวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 44 หน้า.

กรมส่งเสริมการส่งออก. 2555. สินค้าผัก ผลไม้กระป๋อง และแปรรูป. สำนักส่งเสริมสินค้าส่งออก. ที่มา: <http://www.ditp.go.th/Default.aspx>

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์. 2546. แนวทางการจัดวัชพืชในแปลงสับปรด. หน้า 40-48. ใน: เอกสารประกอบการอบรมสัมมนาการพัฒนาองค์กรและเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP). 2-4 มิถุนายน 2546 ณ โรงแรมสตาร์ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง.

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์. 2551. การจัดการศัตรูพืชเพื่อผลิตสับปรดคุณภาพ. กรมวิชาการเกษตร. 93 หน้า.

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์ เสริมศิริ คงแสงดาว สมพร เจริญรุ่งเรือง และศศิธร วสุนันต์. 2543. ศึกษาอัตราใช้สารกำจัดวัชพืชระดับต่างๆ ที่มีผลต่อการเกิดผลแทนของสับปรด. หน้า 56-65. ใน: รายงานการประชุมวิชาการกองพฤกษศาสตร์และวัชพืช 14-16 มีนาคม 2543 ณ คลองทรายรีสอร์ท เขาใหญ่ นครราชสีมา.

เกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์ มาลี ชวนะพงศ์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย สมพร เจริญรุ่งเรือง จารินี จันทร์คำ และกิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร. 2550. โครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูสับปรดเพื่อแก้ปัญหาโรคเหี่ยว. ผลงานวิจัยระดับดีมาก ปี 2550 กรมวิชาการเกษตร. 38 หน้า.

จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 198 หน้า.

จินดารัฐ วีระวุฒิ. 2541. สับปะรดและสรีรวิทยาการเจริญเติบโตของสับปะรด. สำนักพิมพ์

มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 196 หน้า.

ชลลดา โพธิ์จำ. 2548. การใช้เทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ *Erwinia* spp. สาเหตุโรคน้ำและของ

ผักภายหลังการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 94 หน้า.

ณัฐพร อุทัยมงคล. 2548. การศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Erwinia stewartii* สาเหตุโรคเหี่ยว

ของข้าวโพดในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก. กลุ่มงานวิชาการกักกันโรคพืช กลุ่ม

วิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

เดช อยู่ชา ประสิทธิ์ จันศรีสวัสดิ์ และกำภู สะท้อนไตรภพ. 2539. การใช้อินทรีย์วัตถุปรับปรุงดิน

ในไร่สับปะรด จังหวัดประจวบคีรีขันธ์. หน้า 94-100. ใน : รายงานสัมมนาวิชาการ

สับปะรด ครั้งที่ 2. 27-29 พฤษภาคม 2539 ณ โรงแรมโนโวเทล เจมส์ ชะอำ จังหวัด

เพชรบุรี

นันทิยา วรรณะภูติ. 2542. การขยายพันธุ์พืช. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 449 หน้า

นิพนธ์ วิสารทนนท์. 2542. โรคสับปะรด. หน้า 146-154. ใน : โรคไม้เขตร้อนและป้องกันกำจัด.

เอกสารวิชาการ โครงการเพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคมเนื่องจากวิกฤตการณ์ทาง

เศรษฐกิจ. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิโลบล สุจสินธุ์. 2548. วิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคต้นแห้งตายของขนุน และ

จำปาละโดยเทคนิคพีซีอาร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรุงเทพฯ.

ประเทือง ลักษณะวิมล. 2546. การใส่ปุ๋ยกับสับปะรด. หน้า 17-39. ใน : เอกสารประกอบการอบรม
สัมมนา การพัฒนาองค์กรและเกษตรดีที่เหมาะสม (GAP). 2-4 มิถุนายน 2546 ณ โรงแรม
สตาร์ อำเภอเมือง จังหวัดระยอง.

ประสงค์ ตั้งคณะภักย์. 2520. การทำไร่สับปะรดเพื่อการค้า บ้านทรายทอง. ภาควิชาภูมิศาสตร์ คณะ
สังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พิพัฒน์ เชื้อขงหลิว. 2539. โรคและความผิดปกติในสับปะรด. หน้า 206-227. ใน : รายงานสัมมนา
วิชาการสับปะรด ครั้งที่ 2. 27-29 พฤษภาคม 2539 ณ โรงแรมโนโวเทล เจมส์ ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี.

มณีวรรณ สุขสมทิพย์. 2554. การโคลนยีนเบื้องต้น. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
กรุงเทพฯ. 251 หน้า.

รุ่งรัตน์ วาไรเขต. 2548. การจัดจำแนกและการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุ
โรคต้นเหียงตายของขนุนและจำปาตะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ.

วิจิตร เบญจศีล. 2539. นโยบายการวิจัยและพัฒนาสับปะรดของกรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-8

วิจิตร วังใน. 2545. สับปะรดพืชอุตสาหกรรม. เจริญรัฐการพิมพ์ กรุงเทพฯ. 98 หน้า.

วิชัย ก่อประดิษฐ์ นิพนธ์ ทวีชัย และเกลียวพันธ์ สุวรรณรักษ์. 2546. เทคโนโลยีการผลิตและการ
แปรรูปสับปะรด. เอกสารประกอบการอบรม โครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตหน่อ
สับปะรดคุณภาพ. 8 ตุลาคม 2546 ณ จังหวัดกระบี่. 61 หน้า.

สมยศ หวังเจริญ. 2536. การปลูกสับปะรดในสวนมะพร้าว. หน้า 35-38. ใน: หนังสือความรู้งาน
นิทรรศการสับปะรดไทย ครั้งที่ 7. จัดพิมพ์โดย บริษัทสับปะรดไทย จำกัด (มหาชน)
อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. **สถิติการส่งออก**. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุปราณี บุญโนนแต่. 2553. **การพัฒนาวิธีการตรวจสอบโรคใบขาว้อยอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กำแพงแสน. นครปฐม.

สุภาพร ชุมพงษ์. 2546. **การบังคับการออกดอกของสับปะรด**. หน้า 49-51 ใน : เอกสารประกอบการอบรมสัมมนา การพัฒนาองค์กรและเกษตรกรที่เหมาะสม (GAP). 2-4 มิถุนายน 2544 ณ โรงแรมสตาร์ อำเภอเมืองจังหวัดระยอง.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2536. **พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 252 หน้า.

Avrova, A.O., L.J. Hyman, R.L. Toth and I.K. Toth. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 : 1499-1508.

Bartholomew, D.P. and E.P. Malezieux. 1994. **Pineapple**. Pages 243-291. In : Environmental Physiology of Fruit Crops. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida.

Bartholomew, D.P. and R.E. Paull. 1986. **Pineapple**. Pages 371-388. In : Handbook of fruitset and Development. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida.

Beji, A., J. Mergaert, F. Gavini, D. Izard, K. Leclerc, H.& J. De ley. 1988. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*, and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 38:77-88.

Benjamin Kaufman, Stacy Richards, David A. Dierig. 1999. **DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species**. Journal industrial crops and products 9:111-114.

- Bos, L. 1999. **Ecology of Viruses in Plant Viruses Unique and Intriguing Pathogens**. Pages 193-216. In a textbook of plant virology. Backhuys Publishers, Leiden Netherlands.
- Caswell, E.P., J.L. Sarah and W.J. Apt. 1990. **Nematode parasites of pineapple**. Pages 519-537. *In* : Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. International Mycological institute, Kew, England.
- Collins, J.L. 1960. The Pineapple : Botany, Cultivation and Utilization. **Leonard Hill (Books) limited**, London. 244 pp.
- Collmer, A. and N. T. Keen. 1986. The role of pectin enzyme in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.** 24: 383-409.
- Connelly, P.R. 1972. **The effects of thermoperiod on the carbondioxide uptake and compensation point of the pineapple plant *Ananus comosus* (L.) Merr.** Ph,D **Dissertation**, University of Hawaii, Honolulu.
- Coppens d' Eeckkenbrugge, G., F.Leal and M.F. Duval. 1997. **Germplasm resources of pineapple**. Host Rev.21 : 133-175.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Mol. Biol. Rep.** 1: 19-21
- Ekern, P.C. 1965. Evapotranspiration of pineapple in Hawaii, **Plant Physiol.** 40 : 736-739.
- Gortner, W.A. 1960. Internal temperatures of pineapple fruit. I. Diurnal variations and effects of exposure, shading and wetting of the fruit, **PRI News.** 8, 122, Private document, Pineapple Research Institute of Hawaii.

Hauben, L., E. R. B. Moore, L. Vauterin, M. Steenackers, L. Verdonck and J. Swings. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. **Syst. Appl. Microbiol.** 21: 384-387.

Hu, J.S., D.M. Sether and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealyboge using monoclonal antibodies. **Plants Pathology** 45 (5): 829-836.

Jen-Fen Fu, Jer-Ming Hu, Yu-Sun Chang, and Shih-Tung Liu. 1998. Isolation and Characterization of Plasmid pSW200 from *Erwinia stewartii*. **Molecular Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology**, Chang-Gung University, Taiwan. **PLASMID** 40: 100–112.

Joshi, M.C., J.S. Boyer and P.J. Kramer. 1965. Growth, carbondioxide change, transpiration and transpiration ratio of pineapple. **Bot. Gaz.** 126 : 174-179.

Kerns, K.R., J.L. Collins and H. Kim. 1936. Developmental studies of the pineapple *Ananus comosus*. I. Orrigin and growth of leaves and fruit. **New Phyt.** 35: 305-307.

Krauss, B.H. 1948. Anatomy of the vegetative organs of pineapple *Ananus comosus* (L.) Merr. I. Introduction, organography, the stem and the lateral branch or axillary buds. **Bot. Gaz.**, Chicago. 110: 159-217.

Mergaert, J.,L. Verdonck and K. Kersters. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym., *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano 1928) comb. nov. and *Pantoea stewartii* (Smith 1898) comb. nov., respectively, anddescription of *Pantoea stewartii* subsp. indologenes subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 43: 162-173.

Neild, R.E. and F. Boshell. 1976. An agrochimatic procedure and survey of the pineapple production potential of Columbia. **Agricultural Meteorology.** 17: 81-92.

Ochse, J.J. 1961. **Tropical and Sub-tropical Agriculture**. London Macmillan. 168 pp.

Pataky, J.K. and R. Ikin. 2003. **The risk of introducing *Erwinia stewartii* in maize seed**.

Online. A pest risk analysis prepared for the international seed federation, Nyon, Switzerland.

Pepper, E.H. 1967. Stewart's Bacterial Wilt of Corn. **The American Phytopathological Society, Heffernan press.**, Worcester, Mass.

Perombelon M. C. M. and A. Kelman. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. **Annu. Rev. Phytopathol.** 18: 361-387.

Perombelon M. C. M. and A. Kelman. 1987. Blackleg and other potato diseases caused by soft rot erwinias: a proposal for a revision of the terminology. **Plant Disease** 71:283-285.

Perombelon M. C. M. 2002. Potato disease cause by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. **Plant Pathol.** 18:361-387.

Py, C., J.J. Lacocuilhe and C. Teisson. 1987. **The pineapple, Cultivation and Uses**. Eds. Maisonnenuet et Larose, Paris. 568 pp.

Rakhi Agrawal et al., 2009. DNA Isolation from *Rhizobium* by Phenol Chloroform Method. **Protocol Online**. Date Added: 02/02/2009.

Ravoof, A.A. 1973. **Effects of root temperature and nitrogen carriers on nutrient uptake, growth and composition of pineapple plants *Ananus comosus* (L.) Merr.**, Ph.D. Dissertation, Univ. of Hawaii, Honolulu.

- Rohrbach, K.G. 1983. **Pineapple diseases and pests and their potential for spread.** Pages 145-171. In: Exotic Plant Quarantine Pests and Procedures for introduction of Plant Materials. ASEAN Plant Quarantine Centre and Training Institute, Sardang, Salangor, Malaysia.
- Rohrbach, K.G. and D.P. Schmitt. 1998. **Pineapple diseases caused by fungi.** Pages 47-50. In: Compendium of Tropical Fruit Diseases. APS Press, American Phytopathological Society.
- SaKai, W.S. and W.G. Sanford. 1980. **Ultrastructure of the water absorbing trichomes of pineapple.** Ann. Bot. 46: 7-11
- Schaad, N.W., J.B. Jone and W. Chun. 2001. **Laboratory Guide for Plant Pathogenic Bacteria.** American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.
- Sether, D.M. and J.S. Hu. 2002. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt-associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. **Plant Diseases** 86: 867-874.
- Sulaiman, S.F.M. 2000. **Pineapple production and research in Sri Lanka.** Pages 89-92 In: Proceedings of the Third International Pineapple Symposium. Pattaya, Thailand.
- Tuite, J. 1969. Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company. Minneapolis. 239p.
- Williams, C.N. 1982. **Pineapple: *Ananus comosus*.** Pages 38-49. In: Agronomy of the Major Tropical Crops. Oxford University Press, London.
- Yan Liu., B. Sun, X. Wang, C. Zheng and G. Zhou. 2007. **Three digoxigenin-labeled cDNA probes for specific detection of the natural population of Barley yellow dwarf viruses in China by dot-blot hybridization.** Journal of Virological Methods. 145: 22-29





1. Endo agar เป็น Selective media ที่ใช้ในการ test และ isolate พวกร Coliform bacteria โดยมี fuchsin sulphate เป็น indicator แยก lactose forming bacteria และ non-lactose forming bacteria ออกจากพวกอื่นสูตรอาหาร Endo agar ประกอบด้วย

Peptone	10.0 gm
Lactose	10.0 gm
Dipotassium phosphate	3.5 gm
Sodium sulphite	2.5 gm
Basic fuchsin	0.4 gm
Agar	15.0 gm
H ₂ O	1,000.0 gm

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ในที่ที่มืดแสง

2. Nutrient glucose agar (oxygen relationship)

Beef extract	3.0 gm
Peptone	5.0 gm
Glucose	2.5 gm
Agar	15.0 gm
H ₂ O	1,000.0 gm

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บไว้ในที่ที่มืดแสง

3. อาหารเหลว LB (Liquid Broth) ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย

ประกอบด้วย Tryptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 7.4 โดยใช้ NaOH จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวมาทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ้าต้องการเติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 mg/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4. อาหารแข็ง LB ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย

ประกอบด้วย Tryptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม และ NaCl 5 กรัม และ Agar 15 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร และปรับ pH ให้ได้ 7.4 โดยใช้ NaOH จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวมาทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ถ้าต้องการเติมสารปฏิชีวนะ ampicillin หลัง autoclave โดยปล่อยให้อาหารเย็นลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จึงเติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 50 mg/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petridish)

5. อาหารเหลว SOC ใช้สำหรับเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* สำหรับเตรียม competent cell หรือใช้สำหรับถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย

ประกอบด้วย Tryptone 2% (w/v), Yeast extract 0.5% (w/v), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM Glucose จากนั้นนำสารผสมดังกล่าวมาทำให้ปราศจากเชื้อ ด้วยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากการ autoclave แล้วจึงเติมสารละลาย 20 mM Glucose ที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน



1. ความเป็นมาของสับปะรด

สับปะรด *Ananas comosus* (L.) Merr. เป็นพืชวงศ์ Bromeliaceae มีกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปอเมริกา ชาวอินเดียพื้นเมืองได้พัฒนา คัดเลือกสับปะรดพันธุ์ป่า ซึ่งมีอยู่ดั้งเดิมในถิ่นกำเนิด จนได้สับปะรดพันธุ์ที่ใช้ปลูกแพร่หลายไปสู่แหล่งอื่นๆ เช่น บราซิล เวเนซุเอลา โคลัมเบีย ปานามา และหมู่เกาะแอนติลีส ชาวเมืองรู้จักใช้ประโยชน์จากสับปะรดนอกจากเป็นอาหารแล้วยังใช้เป็นยาช่วยเจริญอาหาร และมีสรรพคุณอื่นๆอีกหลายประการ (Collin, 1960)

ในปี ค.ศ. 1885 มีการนำตะเกียงสับปะรดจากประเทศจาเมกาไปปลูกที่เกาะฮาวาย พบว่าสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียมีลักษณะเด่นกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จึงขยายพื้นที่ปลูกโดยนำพันธุ์ดังกล่าวจากควีนส์แลนด์ จำนวน 1 ล้านต้นทำให้เกาะฮาวายเป็นแหล่งผลิตวัตถุดิบที่สำคัญของอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง และเป็นแหล่งผลิตสับปะรดที่ใหญ่ที่สุดของโลกเป็นเวลานาน มีบันทึกไว้ว่าปี ค.ศ. 1901 เป็นระยะเริ่มต้นของอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องขนาดใหญ่ ผู้ที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาอุตสาหกรรมนี้คือ James D. Dole (จินดาวิชัย, 2541)

ความเป็นมาของการปลูกสับปะรดในประเทศไทย ประมาณปลายคริสต์ศตวรรษที่ 17 สันนิฐานว่ามีการนำสับปะรดเข้ามาในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2223-2243 โดยชาวโปรตุเกสซึ่งติดต่อค้าขายในรัชสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราช สับปะรดที่นำเข้ามาปลูกในยุคนั้นคาดว่าเป็นกลุ่มสเปนนิช (Spanish) เช่น พันธุ์อินทรี ซึ่งมีการปลูกกันทั่วไปจนเข้าใจว่าเป็นพันธุ์พื้นเมือง (จารุพันธ์, 2526; Williams, 1982)

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ปลูกกันมากในปัจจุบันเพื่ออุตสาหกรรมแปรรูปและบริโภคสด แหล่งปลูกสำคัญอยู่ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เริ่มปลูกในอำเภอปราณบุรีโดยนำพันธุ์มาจากประเทศอินโดนีเซีย ส่วนแหล่งปลูกในภาคตะวันออกนำพันธุ์มาจากประเทศอินเดีย และนำไปปลูกที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี สับปะรดที่ปลูกในพื้นที่ทั้งสองแห่งมีรสชาติเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และเหมาะสำหรับการแปรรูปเป็นสับปะรดกระป๋อง (จารุพันธ์, 2526)

ในแหล่งปลูกทางภาคเหนือ มีการนำพันธุ์ปัตตาเวียจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ไปปลูกที่จังหวัดลำปาง ตั้งแต่ พ.ศ. 2460 แต่ไม่แพร่หลายนัก จนถึงปี พ.ศ. 2510-2514 มีโรงงานผลไม้กระป๋องไปดำเนินการ การปลูกสับปะรดจึงขยายตัวขึ้น (ประสงค์, 2520) พื้นที่ปลูกสับปะรดในภาคนี้ขยายเพิ่มมากขึ้น โดยมีการปลูกที่อำเภอแม่สาย อำเภอแม่จัน จังหวัดเชียงราย เพื่อบริโภคสด

และแปรรูป แต่จะรู้จักกันมากคือสับปะรดบริโกสดพันธุ์ปัตตาเวีย ปลูที่ตำบลนางแล อำเภอเมือง จึงเรียกสับปะรดนางแล มีรสชาติดี กลิ่นหอม เช่นเดียวกับพันธุ์ภูแล (พันธุ์ภูเกิด) ซึ่งนิยมสำหรับ ตลาดบริโกสด พื้นที่เพาะปลูกในภาคเหนือตอนล่างคือ อำเภอนครไทย จังหวัดพิษณุโลก ปลูพันธุ์ปัตตาเวีย สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป สำหรับสับปะรดที่มีรสชาติดีอีกแหล่งหนึ่งคือ แหล่งปลูอำเภอน้ำปาด จังหวัดอุตรดิตถ์ นำสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากภาคตะวันออกไปปลูกัน มาก มีแนวโน้มจะเป็นแหล่งปลูสำคัญเพื่อบริโกสด (เกลียวพันธ์ และคณะ, 2550)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของสับปะรด

สับปะรดเป็นพืชอยู่ในวงศ์ Bromeliaceae สกุล *Ananas* มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* (L.) Merr. คำว่า *Ananas* แปลมาจากคำว่า na-na ซึ่งเป็นชื่อที่ชนชาวอินเดียน เผ่าทูปิ ใช้ เรียก มีความหมายว่า excelling หรือ fragrance (Collins, 1960) พืชวงศ์นี้แบ่งเป็น 2 กลุ่มตาม ลักษณะที่อาศัย หรือนิเวศวิทยา ได้แก่

1. พืชที่อาศัยอยู่ที่ดอนหรือบนดินทั่วไป (terrestrial plants) มีระบบรากเจริญอยู่ในดิน ได้รับธาตุอาหาร ความชื้นจากการให้ทางดินเป็นส่วนใหญ่
2. พืชที่อาศัยพืชอื่นหรือวัสดุอื่น (epiphytes) มีระบบรากเจริญอยู่บนวัสดุอื่น เช่น ต้นไม้ ใบไม้ เปลือกไม้ ได้รับแร่ธาตุและความชื้นส่วนใหญ่จากวัสดุที่คงอยู่อาศัย

พืชในวงศ์ Bromeliaceae มีประมาณ 1,400 ชนิด ชนิดเดียวที่มีคุณค่าทางอาหารคือ สับปะรด ซึ่งอยู่ในสกุล *Ananas* พืชวงศ์นี้ยังมีอีกหลายชนิดที่ใช้เป็นไม้ประดับและเส้นใยในใบเพื่อ เป็นประโยชน์ทางการค้า (Collins, 1960)

การจำแนกทางหลักพฤกษศาสตร์ *A. comosus* เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Monocotyledon) เป็น ไม้เนื้ออ่อนมีอายุหลายปี ผลสับปะรดเป็นผลรวมซึ่งเกิดจากผลย่อยหลายผลเจริญมาเชื่อมต่อกันจนดู เสมือนเป็นผลเดี่ยว โดยทั่วไปสับปะรดที่ใช้ปลูกันในปัจจุบันจะขยายพันธุ์โดยส่วนของลำต้น ได้แก่ หน่อ (sucker) ตะเกียง (slip) และจุก (crown)

หน่อ พัฒนามาจากตาที่อยู่ในมุมใบของลำต้นซึ่งเจริญภายหลังผลสับปะรดพัฒนาไปได้ ระยะหนึ่งหลังจากเก็บเกี่ยวผลสับปะรดจากต้นแม่หรือต้นปลู (plant crop) แล้ว ต้นแม่จะเลื่อม

โทรม หน่อที่เกิดจากมุมใบของลำต้นก็จะเจริญเติบโตเป็นสับปะรดต้นใหม่ เรียกว่า สับปะรดหน่อรุ่นแรก (first ratoon) หรือสับปะรดต้นต่อที่ 1 เมื่อต้นต่อที่ 1 ให้ผลแล้วตาที่อยู่ที่มุมของใบของหน่อรุ่นแรกก็จะเจริญเป็นต้นใหม่อีก สับปะรดต้นใหม่ที่เกิดจากตาตามมุมใบของหน่อรุ่นแรกก็เรียกว่า หน่อรุ่นที่ 2 (second ratoon) หรือสับปะรดต้นต่อที่ 2 การเกิดต้นใหม่สืบเนื่องเช่นนี้จะกันไปได้กี่รุ่น ขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของสับปะรด หน่อสับปะรดมีหลายชนิดเรียกชื่อต่างกันตามที่เกิดของหน่อ (Collins, 1960) หน่อที่เกิดจากตาที่อยู่ตามมุมใบหรือบริเวณจุดเชื่อมระหว่างผลกับลำต้น เรียกว่าหน่ออุ้มลูก ถ้าเป็นหน่อเกิดจากตาบนลำต้นส่วนที่อยู่เหนือผิวดิน เรียกว่าหน่อข้าง (air sucker) ใช้น้ำขยายพันธุ์ได้ดี หน่อที่ดีควรอยู่ใกล้ผิวดิน ส่วนหน่อที่เกิดจากตาบนลำต้นที่อยู่ระดับผิวดิน เรียกว่า หน่อดิน (ground sucker) จะมีน้อยและมีขนาดเล็กกว่าหน่อข้าง (เกลียวพันธุ์, 2551)

ตะเกียง (slip) เป็นหน่อที่เกิดจากตาที่อยู่บนก้านผล หรือส่วนบนของก้านผล โดยเฉพาะบริเวณที่ติดกับโคนผลซึ่งมีตาอยู่ตรงมุมใบ อาจมีเพียงหนึ่งหรือหลายตะเกียง หรืออาจไม่สร้างตะเกียงเลย เช่นพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกที่ประเทศไทยมักจะไม่มีสร้างตะเกียง ตะเกียงจะมีขนาดเล็กกว่าหน่อ คือมีน้ำหนัก 200-500 กรัมหากนำไปปลูกจะให้ผลผลิตต้องใช้เวลาานเท่าการปลูกด้วยจุก

ลำต้น (stump) เป็นส่วนสะสมของอาหาร มีลักษณะเป็นข้อและปล้องสั้นๆ คล้ายกระบอกยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0-5.0 เซนติเมตร ลำต้นส่วนเหนือดินมีลักษณะตั้งตรง ส่วนอยู่ใต้ดินจะโค้งเล็กน้อยหากต้นนั้นขยายพันธุ์จากหน่อและตะเกียง แต่ถ้าขยายพันธุ์จากจุกจะมีลำต้นใต้ดินตั้งตรงบริเวณข้อของลำต้นเหนือโคนใบจะมีตา ซึ่งจะเจริญไปเป็นหน่อและราก (เกลียวพันธุ์, 2551)

ใบ (leaves) มีลักษณะรูปร่างเรียวยาวและเป็นร่องโค้ง ลักษณะเป็นร่องโค้งของใบทำให้ใบสับปะรดแข็งแรง ไม่หักพับง่าย (Krauss, 1948) มีการเรียงตัวของใบแบบเวียนรอบลำต้นเบียดกันแน่น เนื่องจากสับปะรดมีปล้องสั้นๆ ใบที่ระดับต่างๆของสับปะรดจะมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน ใบที่ยาวที่สุดจะอยู่กลางลำต้น ความยาวของใบที่เจริญเต็มที่ประมาณ 80 เซนติเมตร ความกว้าง 5 เซนติเมตร ใบอ่อนกว่าที่อยู่ตำแหน่งที่สูงขึ้นมาบนลำต้น จะเพิ่มความยาวขึ้นเรื่อยๆ สับปะรดต้นหนึ่งๆ มี 70-80 ใบขึ้นกับพันธุ์และความสมบูรณ์ของต้น ใบมีเนื้อเยื่อพิเศษ ทำหน้าที่เก็บรักษาน้ำไว้ภายในช่วยให้สับปะรดสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตอยู่รอดในสภาพที่มีความแห้งแล้งยาวนาน ปากใบสับปะรดจะเปิดในเวลากลางคืนและตอนเช้ามืด และปิดในเวลากลางวันจึงเกิดการสูญเสียน้ำน้อย (Joshi *et al.*, 1965) และยังมีไทร โคห์ม (trichome) ซึ่งมีลักษณะเกล็ดสีเทาเงินปกคลุมอยู่

บริเวณด้านล่างของใบ ช่วยป้องกันความร้อนและลดการสูญเสียน้ำจากการคายน้ำของใบ ด้านบนของใบมีลักษณะเรียบเป็นมัน ผิวนอกถูกปกคลุมด้วยคิวติเคิล (cuticle) (Sakai and Sanford, 1980)

ราก (root) รากของสับปะรดเป็นระบบรากฝอย (fibrous root system) มีรากถาวร (adventitious root) จำนวนมาก รากสับปะรดเจริญจากจุดกำเนิดที่อยู่ตามมุมใบของลำต้น ทั้งอยู่ใต้ผิวดินและเหนือผิวดิน ปกติแล้วรากที่เจริญจากลำต้นส่วนที่อยู่ใต้ดิน เรียกว่า รากดิน ซึ่งจะเจริญกระจายอยู่ในบริเวณผิวดินตื้นๆ ภายในพุ่มใบของลำต้น ถ้าดินดีรากจะแผ่กว้างได้เป็นเมตร และหยั่งลึกได้ถึงกว่า 90 เซนติเมตร ถ้าดินแน่นแข็งรากสับปะรดจะอยู่ระดับผิวดิน และหยั่งลึกไม่เกิน 20-30 เซนติเมตร จึงไม่อาจทนสภาพแห้งแล้งได้นาน (Ekern, 1965) รากถาวรรากนี้จะทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและแร่ธาตุอาหารเลี้ยงต้นสับปะรด ถ้ารากนี้เสื่อมสภาพหรือถูกทำลายเนื่องจากศัตรูพืชหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม ก็จะมีรากใหม่เกิดขึ้นจากจุดกำเนิดมาทดแทนสืบเนื่องกันไป (เกลียวพันธุ์, 2551)

ดอก (inflorescence) ช่อดอกสับปะรดเป็นแบบ raceme แต่ละช่อมีดอกย่อยประมาณ 100-200 ดอก แกนกลางของช่อดอกเป็นส่วนต่อเนื่องมาจากก้านช่อดอกซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดเดิมของต้นสับปะรด ดอกย่อยแต่ละดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ เมื่อเริ่มมีการสร้างช่อดอก จะมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอด ซึ่งขยายตัวกว้างกว่าเมื่อมีการสร้างใบตามปกติ และเริ่มมีการสร้างส่วนต่างๆ ของดอกขึ้น ดอกบานตอนเช้าและเหี่ยวตอนเย็น ดอกบานจากโคนช่อไปหาปลายช่อ ดอกแต่ละดอกจะเจริญไปเป็นผลย่อยซึ่งอัดติดกันแน่นรวมเป็นผลใหญ่ ผลย่อยเล็กๆ นี้เรียกว่า ตา ช่อดอกปกติจะมีจำนวนแถวของดอกย่อยในแต่ละแนววงที่ คือ แนวอนมี 8 แถว แนวตั้งมี 13 แถว (Collins, 1960)

ผล (fruit) ผลสับปะรดเกิดและพัฒนาได้โดยไม่ต้องมีการผสมเกสร (parthenocarpy) (Bartholomew and Paull, 1986) ผลสับปะรดเป็นผลรวม (multiple fruit) เกิดจากการเชื่อมติดกันของผลย่อยจำนวน 100-200 ผล ที่เรียงตัวติดกับแนวกลางของช่อดอก ส่วนบนสุดของผลจะเป็นกลุ่มของใบซึ่งเจริญพร้อมๆ กันกับผล และพัฒนาเป็นจุก (crown) ต่อไป ก้านช่อดอกหรือก้านผลจะมีใบสั้นๆ เกิดเวียนรอบก้านผล ใบเหล่านี้จะเรียงกันห่างๆ ที่ส่วนโคนของก้านผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ติดกับโคนผล ผลสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียปกติจะไม่มีเมล็ด เนื่องจากไม่สามารถผสมตัวเองในพันธุ์เดียวกันได้ (self incompatibility) แต่ผลอาจมีเมล็ดเกิดขึ้นได้ถ้ามีการช่วยผสมข้ามพันธุ์ เมล็ดมีขนาดยาว 3-5 มิลลิเมตร กว้าง 1-2 มิลลิเมตร เปลือกเมล็ดแข็งหนาสีน้ำตาล (Collins, 1960)

จุก (crown) เป็นส่วนที่อยู่บนสุดของผลสับปะรด ปกติควรมีจุกเดียว และอาจเจริญเติบโตไปพร้อมๆ กับผล จุกจะมีแกนกลางคล้ายต้นเล็กๆ ประกอบด้วยอาหาร เช่น แป้ง สะสมอยู่ และมีเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอด แกนกลางของจุกจะต่อเนื่องจากแกนกลางของผลซึ่งต่อเนื่องกับก้านผล จุกได้รับธาตุอาหารผ่านทางแกนกลางและก้านผล เมื่อสับปะรดสุกแก่เต็มที่ จุกจะหยุดการเจริญเติบโตแล้วพักตัว จุกเป็นส่วนขยายพันธุ์ที่ดีของสับปะรดแม้จะใช้เวลานาน 18-24 เดือน จึงจะเก็บเกี่ยวผลผลิตตามธรรมชาติ แต่จุกก็มีความสม่ำเสมอ และมีรากมากทำให้สับปะรดแข็งแรง สามารถไวต่อได้ดีกว่าหน่อ (เกลียวพันธุ์, 2551)

ก้านผล (peduncle) เป็นส่วนที่รองรับผล และเป็นทางลำเลียงน้ำและแร่ธาตุอาหารจากต้นไปสู่ผล และจุก บนก้านผลจะมีใบสั้นๆ เกิดเวียนรอบผล บริเวณมุมใบของก้านผลมีตาเล็กๆ พักตัวอยู่ เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมจะเจริญคล้ายต้นใหม่ หรือหน่อใหม่ เรียกว่า ตะเกียง (slip) ผิวก้านผลจะเป็นตัวบ่งบอกว่า ผลสับปะรดสุกแก่เพียงใด คือถ้าผลแก่พร้อมเก็บเกี่ยว ก้านผลจะเหี่ยวเป็นแนวยาว (เกลียวพันธุ์, 2551)

3. ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสับปะรด

อุณหภูมิ (temperature) สับปะรดปลูกได้ทุกแหล่งของโลกที่มีอุณหภูมิระหว่าง 21-27 องศาเซลเซียส (Ochse, 1961) อุณหภูมิสูงกว่า 27 องศาเซลเซียส อาจทำให้สับปะรดคายน้ำมากขึ้น แต่ก็สามารถเจริญเติบโตได้ เนื่องจากเป็นพืชทนแล้ง และทนทานต่อระดับอุณหภูมิสูงมากในเวลากลางวัน เช่นในฤดูร้อนของประเทศไทย บางวันตอนบ่ายมีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส สับปะรดก็สามารถเจริญเติบโตได้ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ประมาณ 24-30 องศาเซลเซียส (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ในแหล่งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ทำให้สับปะรดชะงักการเจริญเติบโต มีคำแนะนำว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมควรจะเป็น 20 และ 30 องศาเซลเซียส ในช่วงกลางวันและกลางคืน หรือกล่าวว่าคุณภาพของสับปะรดจะดีที่สุดที่ระดับอุณหภูมิเฉลี่ย 25 องศาเซลเซียส (Neild and Boshell, 1976)

ความชื้น (humidity) สับปะรดเป็นพืชทนแล้ง เนื่องจากมีปากใบน้อยและมีขนาดเล็ก มีไหม้โคมจำนวนมากช่วยปกคลุมปากใบ และมีเยื่อเก็บน้ำไว้ใช้ในช่วงแล้ง มีการสังเคราะห์แสงแบบ CAM (crassulacean acid metabolism) ทำให้สับปะรดมีการคายน้ำน้อย และมีประสิทธิภาพในการใช้น้ำสูง แม้ว่าจะสามารถเจริญเติบโตในสภาพแห้งแล้งได้แต่การที่สับปะรดต้องขาดน้ำเป็นเวลานานๆ จะทำให้ชะงักการเจริญเติบโตและใบเหี่ยว ถ้าเป็นช่วงติดผลก็จะทำให้ผลไม่พัฒนา

คุณภาพผลผลิตด้อย ก้านผลแสดงอาการเหี่ยวอย่างชัดเจน พื้นที่ปลูกควรมีฝนกระจายอย่างสม่ำเสมอตลอดปี มีปริมาณน้ำฝนประมาณ 1,000-1,500 มิลลิเมตรต่อปี (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ถ้าความแห้งแล้งเกิดรุนแรงต่อเนื่องกันนาน ทำให้ใบสับปะรดเหี่ยวเป็นสีแดง ปลายใบแห้งและขอบใบม้วนเข้าหากัน หยุดการสร้างใบใหม่ (Py *et al.*, 1987) แต่อาการดังกล่าวจะค่อยๆ หายไปเมื่อได้รับน้ำอย่างเพียงพออีกครั้ง สังเกตได้ว่าถ้าสับปะรดเคยผ่านช่วงการขาดน้ำ จะเห็นรอยคอดตรงบริเวณที่เริ่มมีการเจริญเติบโตใหม่ ต้นสับปะรดที่แสดงอาการเหี่ยวเนื่องจากการขาดน้ำ มีลักษณะคล้ายกับระบบรากถูกทำลายด้วยโรคและแมลงศัตรู หลังบังคับดอกหรือเมื่อสับปะรดติดผลแล้ว ถ้าขาดน้ำจะทำให้จำนวนผลย่อยลดลง แต่ถ้าขาดน้ำในช่วงที่ผลพัฒนาแล้ว น้ำหนักผลย่อยจะลดลง ทำให้ได้ผลขนาดเล็ก และถ้าขาดน้ำในช่วงการแตกหน่อจะทำให้การผลิหน่อลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในทางกลับกันถ้าสับปะรดได้น้ำมากเกินไปหรือท่วมขังก็จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต และผลผลิต ดินที่มีน้ำท่วมขังทำให้การระบายอากาศไม่ดี รากสับปะรดไม่พัฒนา และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ปกติ ผลสับปะรดที่ถูกน้ำท่วมขังในระยะใกล้เก็บเกี่ยวจะทำให้เนื้อไม่แน่น เนื้อผลจะสุก ในขณะที่เปลือกยังเป็นสีเขียวอยู่ (Bartholomew and Malezieux, 1994)

แสงแดด (sunlight) สับปะรดเป็นพืชที่ต้องการแสงแดด เพื่อการเจริญเติบโตของลำต้น การพัฒนาดอกและผล ซึ่งปกติการเจริญเติบโตทางลำต้นใช้เวลา 8-14 เดือน ช่วงออกดอกติดผลใช้เวลา 5-7 เดือน (Kerns *et al.*, 1936) แม้ว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น อุณหภูมิและความชื้นของดินจะมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสับปะรดมากกว่าแสงแดด แต่ก็มีงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าสับปะรดที่เจริญเติบโตในสภาพได้รับแสงแดดน้อย จะมีใบยาวและสีเขียวเข้ม แต่สับปะรดที่ได้รับแสงมาก ใบจะมีเคลือบสีแดง และจะมีความแข็งแรงกว่า (Py *et al.*, 1987) นอกจากนี้สับปะรดที่ปลูกในสภาพพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ การเจริญเติบโตในช่วง 6 เดือนแรก ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์การใช้น้ำในโตรเจนจะมีประสิทธิภาพต่ำด้วย (Connolly, 1972) ต้นสับปะรดในระยะ 3-4 เดือนก่อนออกดอก หากมีการพรางแสง 70 เปอร์เซ็นต์จะออกดอกช้ากว่าปกติ ประมาณ 5 เดือน ปริมาณแสงที่พืชได้รับช่วงการสร้างดอกและผล มีส่วนในการเพิ่มขนาดผล ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนหรือขนาดผลย่อย (Bartholomew and Malezieux, 1994) ความผิดปกติของจุกสับปะรดหรือการมีหลายจุกมีความสัมพันธ์กับช่วงที่มีอากาศร้อนและแสงแดดจัดที่ต้นสับปะรดได้รับในระยะแรกของการพัฒนาดอก แสงมีผลต่ออุณหภูมิของผลสับปะรด ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของผลสับปะรด อุณหภูมิสูงจะช่วยให้เร่งการเจริญเติบโตให้เร็วขึ้น แต่ถ้าผลสับปะรดถูกแสงแดดมากเกินไป โดยเฉพาะในช่วงเวลา 15.00 น.จะทำให้เปลือกผลไหม้ และเนื้อผลเสียหาย การใช้กระดาษใบหญ้า เป็นวัสดุบังแสง เป็นการเพิ่มต้นทุน การใช้อัตราปลูกให้

สูงขึ้นทำให้ใบสับปะรดห่อหุ้มผลช่วยบังแสง และยังทำให้เนื้อสับปะรดมีคุณภาพดีด้วย (Gortner, 1960)

ดินและความอุดมสมบูรณ์ของดิน พื้นที่ปลูกสับปะรดส่วนมากเป็นดินทรายชั้นน้ำใต้เร็ว แต่ดินที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของสับปะรดเป็นดินเนื้อหยาบ เช่น ดินทราย ดินร่วน ดินร่วนปนทราย หรือดินทรายปนลูกรัง มีระดับหน้าดินลึกไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร การระบายน้ำและการถ่ายเทอากาศดี และมีความลาดเอียง ประมาณ 1-3 เปอร์เซ็นต์ มีอินทรีย์วัตถุไม่ต่ำกว่า 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปดินที่เหมาะสมกับการปลูกสับปะรดจริง ๆ นั้นมีน้อย โดยเฉพาะความอุดมสมบูรณ์ของดินจะลดลงเมื่อพื้นที่นั้นๆ มีการปลูกสับปะรดหลายๆ ฤดู ทำให้ผลผลิตลดลง การขยายพื้นที่ปลูกก็ทำได้ยาก จึงต้องปรับปรุงบำรุงดินด้วยการใส่ปุ๋ย และมีการจัดการดินอย่างถูกวิธี เพื่อให้ดินรักษาความชื้นได้นาน (กรมวิชาการเกษตร, 2545)

4. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ธาตุอาหารของสับปะรด

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ธาตุอาหารของพืช อย่างเหมาะสม คือความเป็นกรด-ด่างของดิน ควรอยู่ระดับกลาง ซึ่งพืชจะได้ประโยชน์จากแร่ธาตุในดินได้ แต่สับปะรดชอบดินที่มีความเป็นกรดน้อย คือ มีค่า pH ระหว่าง 4.5-5.5 ถ้าดินเป็นด่าง คือมีค่า pH มากกว่า 8 จะทำให้สับปะรดไม่สามารถดูดธาตุฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กมาใช้ได้ สับปะรดจะมีการขาดธาตุอาหาร เช่น สับปะรดปลูกบนดินที่มีจอมปลวกซึ่งเป็นด่างมาก สำหรับอินทรีย์วัตถุในดินมีความสำคัญที่จะบ่งบอกประสิทธิภาพการใส่ปุ๋ยของพืช อินทรีย์วัตถุในดินนอกจากจะทำให้สมบัติทางกายภาพของดินดีขึ้น มีความร่วนซุย อุดมน้ำดี ยังเป็นแหล่งให้ธาตุอาหารพืช เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และกำมะถัน และยังเพิ่มความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุบวกของดิน ดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูงจึงมีความสามารถปล่อยธาตุอาหารได้ดี ดินที่ปลูกสับปะรดนานๆ ควรเพิ่มเศษซากพืชและปุ๋ยอินทรีย์ลงสู่ดิน (ประเทือง, 2546)

ดินที่ปลูกสับปะรดติดต่อกันหลายๆ ปี จะทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของดินลดลง สับปะรดจะไม่เจริญเติบโต การเผาซากพืชและต่อเก่าสับปะรดในแปลงปลูกทำให้ดินสูญเสียอินทรีย์วัตถุ จึงต้องมีการเพิ่มอินทรีย์วัตถุเพื่อปรับปรุงดิน เช่น การปั้นดินสับปะรดทิ้งไว้ 3-4 เดือน แล้วไถกลบ เป็นวิธีที่ดีที่สุด และลดต้นทุนการเตรียมดิน (เดช และคณะ, 2539) นอกจากนี้ระดับอุณหภูมิในดินระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส จะทำให้สับปะรดสร้างใบและรากเพิ่มขึ้น 5 เปอร์เซ็นต์ (Ravooft, 1973)

5. สายพันธุ์ของสับปะรด

พันธุ์สับปะรด สับปะรดไม่ผสมตัวเอง จึงเป็นหมันและสร้างผลที่ไม่มีเมล็ด นอกจากจะผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์เพื่อให้ได้เมล็ด ซึ่งจะกระทำเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงสายพันธุ์ การสร้างสายพันธุ์ใหม่ๆ เป็นความพยายามของนักปรับปรุงสายพันธุ์ในหลายๆ ประเทศที่เป็นแหล่งปลูกสับปะรด แต่ก็มีจำนวนน้อยที่มีแนวโน้มว่ามีคุณภาพใกล้เคียงพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้า ยิ่งไปกว่านั้นการผสมกันเองโดยธรรมชาติที่เกิดขึ้นก็มีลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ เช่น สายพันธุ์ผ่าเหล่าจากลักษณะดีมีการสร้างตะเกียบบนก้านผลเป็นจำนวนมาก ทำให้น้ำหนักของผลสับปะรดลดลง (Collins, 1960)

สับปะรดที่ปลูกเป็นการค้าทั่วไป มีความแตกต่างกันไปตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ลักษณะ ต้น ใบ ผล ซึ่งสังเกตได้ไม่ยาก นอกจากลักษณะเนื้อในจะเป็นสิ่งบ่งบอกกลุ่มพันธุ์ได้ง่ายขึ้น จึงมีการจำแนกพันธุ์สับปะรดเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ คะยีน (Cayene) ควีน (Queen) สเปนนิช (Spanish) เปอร์นันบูโก (Pernambuco) มอร์ดิลอนา (Mordilona) (เกลียวพันธุ์, 2551)

ในบรรดาสับปะรดทั้ง 5 กลุ่ม พบว่ากลุ่มกะยีน ควีน และเปอร์นันบูโก มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาอย่างชัดเจน และยังมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่สม่ำเสมอว่า กลุ่มสเปนนิช และมอร์ดิลอนา (Coppens d' Eeckenbrugge *et al.*, 1997) สำหรับพันธุ์สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทย จำแนกได้ 3 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มกะยีน เป็นกลุ่มที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุด เหมาะสมสำหรับวัตถุประสงค์เพื่อโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป พันธุ์ที่แพร่หลายคือ สมูท คะยีน (Smooth Cayene) หรือเรียกทั่วไปว่า พันธุ์ปัตตาเวีย มีขนาดผล 1.0-2.5 กิโลกรัม หรืออาจใหญ่กว่านี้ขึ้นอยู่กับระยะปลูก (spacing) หรือจำนวนต้นต่อพื้นที่ และปัจจัยที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต ลักษณะผลจะเป็นรูปทรงกระบอก (เกลียวพันธุ์, 2551)

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย มีใบสีเขียวเข้ม ด้านบนใบเป็นมันแถบสีแดง หรือม่วง หรือแดงอมน้ำตาล ถ้าแสงแดดจัดได้ใบจะเป็นสีเทาอมเงิน ขอบใบเรียบมีหนามเล็กน้อยที่ปลายใบ ทรงต้นเจริญเต็มที่สูงประมาณ 1 เมตร มีใบประมาณ 100 ใบ ใบยาวที่สุด 80-100 เซนติเมตร เรียกว่า D-leaf ความกว้างประมาณ 4-5 เซนติเมตร มีดอกย่อยเฉลี่ย 150 ดอกต่อช่อ ซึ่งอาจมากขึ้นหรือน้อยลงขึ้นกับสภาพความสมบูรณ์ของลำต้น และสภาพแวดล้อม ผลมีขนาด 1.0-1.5 กิโลกรัม จะเป็นรูป

ทรงกระบอก เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง แต่ถ้าผลมีขนาดใหญ่ขึ้นจะพบว่าปลายผลเรียวเล็กกว่าส่วนโคนผล ปกติสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจะมีลูกเพียงลูกเดียว มีขนาด 0.5-1.5 เท่าของความยาวผล ตาผลตื้นไม่เป็นร่อง เปลือกผลเมื่อดิบมีสีเขียวเข้ม เมื่อใกล้เก็บเกี่ยวจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มบริเวณส่วนล่างของผล ก้านผลสั้น เนื้อสีเหลืองอ่อนและจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น เนื้อแน่นละเอียด มีเยื่อใย (fiber) ปานกลาง ค่อนข้างฉ่ำน้ำ รสชาติหอมหวาน มีปริมาณกรด และน้ำตาลค่อนข้างสูง คือปริมาณกรดเฉลี่ย 0.3-0.75 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาล 12-16 องศาบริกซ์ นับแต่เริ่มบังคับดอกจนถึงวันเก็บเกี่ยวใช้เวลา 180-210 วัน (Kerns *et al.*, 1936)

สับปะรดกลุ่มคะยีน ที่ปลูกในประเทศไทยมากที่สุดคือ พันธุ์ปัตตาเวีย มีชื่อเรียกตามท้องถิ่น เช่น ปลูกทางภาคตะวันออกเรียก สับปะรดศรีราชา ปลูกทางภาคตะวันตกและภาคใต้ตอนบนเรียก สับปะรดปราบบุรี เป็นกลุ่มพันธุ์ที่ค่อนข้างทนความแห้งแล้ง แต่ไม่ทนต่อโรคผลแกน โรครากเน่า ต้นเน่า และโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัส (เกลียวพันธ์ และคณะ, 2550) และกลุ่มคะยีนอีกพันธุ์ที่ปลูกมากที่จังหวัดเชียงราย เรียกสับปะรดนางแล หรือพันธุ์น้ำผึ้ง เป็นพันธุ์ที่ไม่มีเปลือกบาง ผลขนาดเล็กกว่าปัตตาเวีย ผลกลม ผลย่อยหรือตาพูนมีร่อง เนื้อมีเยื่อใยน้อย สีเนื้อเหลืองกว่าปัตตาเวีย รสชาติหวานแหลม (กรมทรัพย์สินทางปัญญา, 2549) การที่ผลกลมนั้นเข้าใจว่าเนื่องจากการแคะลูกตั้งแต่หลังบังคับดอก 2 เดือน

2. กลุ่มควีน มีขนาดต้นและขนาดผลเล็กกว่ากลุ่มคะยีน ก้านผลสั้นใบสีเขียวอ่อน มีแถบสีชมพูที่กลางใบ ขอบใบมีหนามสีแดงเรียงชิดติดกันตลอดความยาวของใบเป็นรูปโค้งมนขึ้นไปหาปลายใบ ใบแคบและมีความยาวของใบมากกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย มีประมาณ 48 ใบต่อต้น ดอกสีน้ำเงินถึงสีม่วง ดอกย่อยมีประมาณ 120 ดอกต่อช่อ ผลมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์อื่นๆ ถิ่นกำเนิดประมาณ 1.0-2.0 กิโลกรัม ลูกมีขนาดใหญ่ ใกล้เคียงขนาดผล มักเกิดตะเกียงประมาณต้นละ 1-2 ตะเกียง ผิวเปลือกสีเขียว เปลือกหนา ดาหนูน เมื่อสุกผิวเปลือกเป็นสีเหลือง เนื้อในเหลืองเข้ม รสชาติหวานกรอบ กลิ่นหอม มีเยื่อใยน้อย แกนผลอ่อน นุ่มและเล็กกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย (Collins, 1960; Ochse, 1961) สับปะรดกลุ่มควีนได้แก่ พันธุ์ภูเก็จ สวี ตราด สีทอง และภูแล สับปะรดกลุ่มควีนตอบสนองต่อโรคเหี่ยวน้อยกว่าคะยีน (เกลียวพันธ์ และคณะ, 2550)

สับปะรดพันธุ์ภูเก็จ มีลักษณะเด่นคือ เนื้อหวานกรอบเหมาะแก่การบริโภคสด ผลเป็นรูปทรงกระบอกสม่ำเสมอ อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 5 เดือน นับตั้งแต่บังคับดอก ให้ผลสม่ำเสมอ ทนทาน ความแห้งแล้ง ตอบสนองต่อสารเคมีที่ใช้เร่งบังคับดอก ใบมีหนามมาก ผลเล็ก ตาลึก เนื้อมีช่องว่างเป็นโพรง เกิดหน่อมากเกินไปจนดูเป็นกอสับปะรด ไม่เหมาะสำหรับบรรจุกระป๋อง

พันธุ์ตราดสีทอง ปลุกกันมานานแล้วที่จังหวัดตราด รู้จักกันในชื่อ พันธุ์สิงคโปร์และสิงคโปร์ ปิดตาเวีย ลักษณะทรงต้นและใบคล้ายพันธุ์สวี และพันธุ์เก็ด พันธุ์สิงคโปร์ปิดตาเวีย ลูกใหญ่ยาว มีเนื้อนุ่มกว่า แกนแข็ง ใส่ลึ่มง่าย ขณะที่พันธุ์สิงคโปร์มีขนาดเล็กกว่า เนื้อกรอบ ตาลึก แต่ทั้ง 2 พันธุ์ ถูกเรียกว่าพันธุ์ตราดสีทอง (เกลียวพันธุ์, 2551)

พันธุ์ภูแล หรือสับประดภูแลเชียงราย ปลุกที่ตำบลนางแล ตำบลท่าสุต และตำบลบ้านคู่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย (กรมทรัพย์สินทางปัญญา, 2549) สับประดภูแลมีใบเรียวยาวเล็ก สีเขียวอ่อน มีแถบชมพูบริเวณกลางใบ ขอบใบมีหนามเรียงชิดติดกันตลอดความยาวของใบ แดกหน่อมาก ขนาดหน่อยาวประมาณ 30 เซนติเมตร น้ำหนักหน่อประมาณ 250 กรัม สับประดภูแลมีผลขนาดเล็ก น้ำหนัก 150-1000 กรัม แต่โดยทั่วไปประมาณ 300-400 กรัม ตาแต่งถึงโปนออกจากผล เปลือกหนา เหมาะสำหรับขนส่งระยะไกล เมื่อสุกเปลือกผลจะมีสีเหลืองหรือสีเหลืองปนเขียว เนื้อสีเหลืองกรอบ เนื้อหอม แกนกรอบรับประทานได้ รสชาติหวาน (เกลียวพันธุ์, 2551)

3. กลุ่มสเปนนิช สับประดกลุ่มนี้มีขนาดผลและขนาดต้นอยู่ระหว่างกลางของกลุ่มกะยีน และควีน มีลักษณะใบบางกว่าพันธุ์ปิดตาเวีย แต่มีขนาดกว้างยาวใกล้เคียงกัน ขอบใบมีหนามรูปโค้งงอสีน้ำตาลอมแดง ผิวใบไม่เป็นมัน ผิวใบเผือกไม่มีร่องเด่นชัดเหมือนพันธุ์ปิดตาเวีย ได้ใบมีสีเขียวและสีขาวปนน้ำเงิน มีใบเฉลี่ย 38 ใบต่อต้น แดกหน่ออ่อน ดอกสีม่วงปนแดง มีดอกเฉลี่ย 64 ดอกต่อช่อ ผลกลมถึงทรงกระบอก มีขนาดเล็กประมาณ 1.0-1.5 กิโลกรัม ผลย่อยนูนเด่นชัด ตาใหญ่ และลึก เปลือกผลเหนียวสีเหลืองปนแดง ทนทานการขนส่งเมื่อแก่จัดสีเนื้อเหลืองทอง รสชาติหวานอ่อน กลิ่นไม่หอม เหมาะสำหรับบริโภคสด ก้านผลสั้นกว่ากลุ่มกะยีน เกิดตะเกียงมากเฉลี่ย 2-7 ตะเกียงต่อต้น และสร้างหน่อ 2-3 หน่อ อายุเก็บเกี่ยวประมาณ 5.5 เดือน ตั้งแต่เริ่มบังคับดอก (จารุพันธุ์, 2526; Collins, 1960 ; Ochse, 1961)

กลุ่มสเปนนิช มีจุดเด่นคือตอบสนองต่อสารบังคับดอก ทนทานต่อโรครากเน่าโคนเน่า ทนทานต่อสภาพการระบายน้ำไม่ดี ผลมีขนาดเล็ก มีเส้นใยมาก ตาลึกจึงไม่เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมแปรรูป ไม่ทนทานต่อโรคเหี่ยว สับประดกลุ่มสเปนนิช ที่ปลุกกันมานานจนกลายเป็นพันธุ์พื้นเมืองของไทย คือ พันธุ์อินทรีชิต หรือ พันธุ์เทพรส หรือ อินทรีชิตแดง ใบมีสีเขียวอมน้ำตาลหรือเขียวคล้ำ มีสีม่วงอมแดงพาดเป็นแถบตามขอบใบทั้ง 2 ด้าน และพันธุ์ขาว หรือ อินทรีชิตเขียว ซึ่งมีใบเขียวอมเหลือง ใบแคบ และสั้นกว่าพันธุ์อินทรีชิตแดง คุณภาพเนื้อไม่ดี มีเยื่อใยสูง แกนผลเหนียว ผลมักมีหลายจุดซึ่งเป็นลักษณะไม่ดี สันนิษฐานว่ากลายพันธุ์มาจากอินทรีชิตแดง

ปลูกร่วมกันที่อำเภอบางคล้าจังหวัดฉะเชิงเทรา (จารุพันธ์, 2526; Collins, 1960) พันธุ์อินทรีชนิดนี้ยังปลูกมากในประเทศมาเลเซีย เรียกว่า Singapor Spanish (Ochse, 1961)

6. การเลือกแหล่งปลูกสับปะรด

การบวนการผลิตให้ได้สับปะรดคุณภาพดี มีผลผลิตต่อไร่สูง มีความคุ้มค่า เพื่อให้แข่งขันราคาในตลาดโลกได้ สามารถรองรับปัญหาการนำกฎระเบียบว่าด้วยการควบคุมความปลอดภัยในการผลิตและบริโภค ได้แก่ ระบบ Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) ระบบสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phyto Sanitary: SPS) มาเป็นเครื่องมือกีดกันทางการค้าของสินค้าเกษตร ซึ่งจะต้องมีระบบการผลิตตามคำแนะนำเกษตรกรที่เหมาะสม (กรมวิชาการเกษตร, 2545)

แหล่งปลูกสับปะรด ปลูกได้ทุกภาคของประเทศไทย ในพื้นที่ใกล้ทะเลจนถึงระดับความสูงไม่เกิน 600 เมตรแต่แหล่งปลูกที่สำคัญจะอยู่บริเวณภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ตอนบน ซึ่งเป็นเศรษฐกิจสับปะรด สะดวกในการขนส่งผลผลิตวัตถุดิบส่งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป และแหล่งซื้อผลผลิต (กรมวิชาการเกษตร, 2545) เนื่องจากสับปะรดต้องการแสงแดดจัด ฉะนั้นการปลูกสับปะรดแซมในสวนยางพารา หรือสวนปาล์มน้ำมันจึงปลูกได้ในช่วง 3-4 ปีแรก เมื่อมีร่มเงาจากพืชหลักสับปะรดจะไม่แข็งแรง ไม่สามารถบังคับดอก แต่การปลูกสับปะรดแซมในสวนมะพร้าวสามารถปลูกได้นานกว่าในสวนยางพารา เนื่องจากร่มเงาน้อยกว่า (สมยศ, 2536) เช่นเดียวกับสับปะรดในประเทศศรีลังกาซึ่งมีการปลูกสับปะรดแซมในสวนมะพร้าว (Sulaiman, 2000)

7. การเตรียมพื้นที่และการปลูก

การเตรียมพื้นที่ การเตรียมพื้นที่ปลูกสับปะรด ต้องจำแนกว่าพื้นที่นั้นเคยปลูกสับปะรดมาก่อนหรือไม่หรือเป็นพื้นที่บุกเบิกใหม่ ซึ่งทั้ง 2 ลักษณะ จะมีวิธีการเตรียมพื้นที่ในระยะแรกแตกต่างกัน (เกลียวพันธุ์, 2551)

พื้นที่บุกเบิกใหม่ ต้องกำจัดต้นพืช ซึ่งอาจมีขนาดใหญ่หรือเป็นไม้พุ่มหรือต้นไม้ออกไปจากพื้นที่ กำจัดวัชพืชซึ่งส่วนมากเป็นวัชพืชรากยาวหลายฤดู ก่อนทำการไถพรวนดินจะช่วยให้การเตรียมดินกระทำได้ง่ายขึ้น (เกลียวพันธุ์, 2551)

พื้นที่เคยปลูกสับปะรดมาก่อน จะมีซากเหง้าของสับปะรดที่กำจัดยากมาก คือ ต้นเก่า หรือ ตอแม่ (mother stump) มีลักษณะสั้นคล้ายกระบอง ยาว 20-30 เซนติเมตร มีความกว้างหรือ เส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 5 เซนติเมตร ต้นเก่ามีตาจำนวนมากที่พร้อมจะแตกเป็นหน่อแซม จะ แข็งแ่งธาตุอาหาร และความชื้นจากหน่อปลูกใหม่ โดยไม่สามารถได้ผลผลิตจากหน่อแซม เหล่านั้น ฉะนั้นจึงต้องกำจัดต้นเก่าออกจากพื้นที่ก่อนการไถพรวนดินขั้นต่อไป แต่ถ้าสามารถไถ บันทันเก่าเหล่านี้ได้ ก็จะได้อินทรีย์วัตถุปรับปรุงดิน (เกลียวพันธุ์, 2551)

วิธีกำจัดซากเหง้าและต้นเก่าสับปะรด อาจจะไถครั้งแรกและคราดไปเผานอกแปลง หรือ ไถสับดินและใบสับปะรดเป็นชิ้นเล็กๆ ตากดิน แล้วไถสับอีกครั้งพร้อมพรวนกลบ การทำลายต้น เก่าสับปะรดนี้ หากเป็นแปลงปลูกเดิมที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวสับปะรดซึ่งที่สาเหตุจากเชื้อ ไวรัส ก็จะเป็นวิธีการตัดตอนการแพร่ระบาดของโรคนี้อีก (เกลียวพันธุ์และคณะ, 2550) และยังเป็น การกำจัดวัชพืชก่อนปลูกสับปะรด ลดชนิดและปริมาณวัชพืชร้ายแรง เป็นขั้นตอนที่ลดการใช้สาร กำจัดวัชพืชภายหลังปลูกสับปะรด (เกลียวพันธุ์, 2546)

การปลูกสับปะรดในพื้นที่ขนาดใหญ่ จะแบ่งแปลงปลูกขนาดกว้าง 38 เมตร หรือ 30-40 เมตร ความยาวไม่เกิน 500 เมตร แปลงปลูกจะมีถนนสลับ ซึ่งถนนกว้าง 3-4 เมตร ต่อเนื่องกันไป ตลอดไร่ มีถนนสายหลักตัดผ่านกลางไร่และรอบไร่เพื่อความสะดวกในการเข้าออกปฏิบัติงานของ เครื่องจักรต่างๆ ความกว้างของแปลงปลูกจะเป็น 2 เท่าของแขนเครื่องพ่นสารกำจัดวัชพืช เรียกว่า คานพ่น (boom sprayer) เมื่อติดหัวพ่นก็จะใช้พ่นสารกำจัดวัชพืช แต่เมื่อจะเก็บเกี่ยวก็จะใส่สายพาน ลำเลียงผลผลิต เรียกว่า สายพานช่วยเก็บเกี่ยว (harvester) การวางรูปแบบแปลงปลูกต้องให้สอดคล้อง กับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่จะใช้ปฏิบัติงาน เพราะต้องทำงานหลายครั้งต่อเนื่องกันไปนาน 3-4 ปี จึง ต้องรื้อแปลงและเตรียมแปลงปลูกใหม่ (จินดารัฐ, 2541 ; วิจิตร, 2545)

การเตรียมวัสดุพันธุ์ หน่อพันธุ์และจุกพันธุ์ ที่จะนำมาปลูก ควรเป็นหน่อใหม่ที่ไม่หักจาก ต้นหรือหน่อสับปะรดนานเกินไป วัสดุพันธุ์ต้องได้จากแหล่งไม่มีโรคเหี่ยวที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส ระบาดทำลาย (เกลียวพันธุ์ และคณะ, 2550) เมื่อได้หน่อพันธุ์หรือจุกพันธุ์แล้ว อย่างวางซ้อนกันเป็น กองใหญ่จะทำให้เน่า ควรกระจายโดยคว่ำจุกหรือหน่อให้ด้านโคนขึ้น ต้องกำจัดเปลือกแข็ง และมด ที่ติดมากับวัสดุพันธุ์ และชุบวัสดุพันธุ์ด้วยสารป้องกันโรคเน่า ต้นเน่า ก่อนปลูกทุกครั้ง ผึ่งวัสดุ พันธุ์ในที่ร่มให้แห้ง พร้อมปลูกในแปลงที่เตรียมไว้ (เกลียวพันธุ์, 2551)

8. โรคอื่นๆ ของสับปะรด

ศัตรูพืชที่สำคัญของสับปะรด ได้แก่ โรค แมลง และวัชพืช การปลูกสับปะรดให้ได้ผลผลิตสูง มีคุณภาพมาตรฐานการส่งออก ทั้งในผลิตภัณฑ์แปรรูป และผลสด จะต้องมีการกำจัดศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อผลผลิตปราศจากการปนเปื้อนศัตรูพืชและสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช การป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างถูกต้องเหมาะสมจะต้องรู้จักศัตรูพืชชนิดนั้นๆ และปฏิบัติตามคำแนะนำในการป้องกันกำจัด ศัตรูพืชแต่ละชนิดมีสาเหตุ ระดับความรุนแรงที่จะทำให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิต วิธีการป้องกันกำจัดแตกต่างกันไป ศัตรูพืชบางชนิดอาจป้องกันกำจัดได้ง่ายด้วยวิธีเฉพาะ แต่ศัตรูพืชบางชนิดก็ต้องใช้หลายวิธี หรือการผสมผสานวิธีการ เพื่อการป้องกันกำจัดจึงจะได้ผล โรคสับปะรดที่สำคัญมีดังนี้

8.1 โรคต้นเน่า – รากเน่า หรือโรคยอดเน่า – รากเน่า (phytophthora heart rot and root rot)

เกิดจากเชื้อราไฟทอปทอรา *phytophthora nicotianae* (Breda de Hann) var. *parasitica* (Duster) G.M. Waterhouse เป็นเชื้อราชนิดเดียวกับที่ทำให้เกิดโรคพืชหลายชนิด เช่น ทุเรียน ส้ม ขางพารา กล้วยไม้ พริกไทย มะเขือยาว และงา (พิพัฒน์, 2539) เชื้อแพร่ระบาดโดยสปอร์ (zoospore) ว่ายน้ำไปกับน้ำ หรือเป็นเส้นใยติดกับซากพืชและดิน เมื่อเชื้อนี้ปนเปื้อนกับเนื้อยอดอ่อน เช่น ยอด ราก หรือแผล จะเข้าทำลายทำให้เกิดโรคต้นเน่า-รากเน่า เชื้ออยู่ในดินได้นาน 2-3 ปี ดินที่เป็นค้างจัดมีโอกาสดเกิดโรคนี้นี้ได้มากกว่าดินเป็นกรด (นิพนธ์, 2542)

การแพร่ระบาด เกิดทุกแหล่งปลูกสับปะรดที่แปลงเตรียมดินไม่ดี ไม่จัดทำทางระบายน้ำ มีน้ำท่วมขังเมื่อฝนตกหนัก ถ้าเชื้อราติดมากับวัสดุปลูกจะเกิดอาการเร็วขึ้น รวมทั้งดินมีเชื้อสาเหตุอยู่แล้ว สภาพอากาศที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส การพักตัวของเชื้อราในดินได้นานถึง 2-3 ปี เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม ก็จะเข้าทำลายต้นสับปะรด (วิชัย และคณะ, 2546)

การป้องกันกำจัด

1) เตรียมดินที่ปลูกสับปะรดให้มีทางระบายน้ำ อย่าให้น้ำท่วมขังนานเมื่อฝนตกหนัก ถ้าเป็นพื้นที่ลุ่มควรปรับระดับให้ลาดเอียงเล็กน้อย หรือควรยกแปลงปลูกถ้าเป็นดินดาน ควรไถระเบิดดินดาน เพื่อให้น้ำซึมลงสู่ใต้ดินได้สะดวก

2) ปรับความเป็นกรด-ด่าง ของดินให้เหมาะสมกับความต้องการของสับปะรดคือ pH

4.5-5.5

3) ไม่ใช้หน่อพันธุ์/จุกพันธุ์ จากแหล่งที่มีโรคต้นเน่า- ยอดเน่า

4) ควรปลูกด้วยหน่อพันธุ์ จะเป็นโรคน้อยกว่าจุกพันธุ์

5) ชุบหน่อพันธุ์สดก่อนปลูก ด้วยฟอสฟอรัสกลูมิเนียม (80% คับบลิฟ) อัตรา 80-100 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร แล้วพ่นซ้ำทุก 2-6 เดือน ถ้าไม่มีการชุบหน่อพันธุ์ก่อนปลูก ให้พ่นด้วยสารดังกล่าวทุกๆ 2-3 เดือน หรือเมื่อมีฝนตกมากติดต่อกัน

6) หลีกเลี่ยงการปลูกสับปะรดในช่วงฝนตกมาก

8.2 โรคหน่อเน่า ผลเน่า ใบจุดขาว (butt rot, base rot, fruit rot, white leaf spot)

เกิดจากเชื้อรา *Chalara paradoxa* (De Seym.) Sacc., หรือ *Thielaviopsis paradoxa* (De Seym.) Hohn. (Rohrbach and Schmitt, 1998) พบทั่วไปในแปลงที่เคยปลูกสับปะรดมาก่อน เมื่อรอยแผลที่โคนหน่อพันธุ์ หรือจุกสัมผัสกับเชื้อนี้ จะเกิดอาการโคนเน่า เชื้อนี้ยังทำให้เกิดอาการใบไหม้ หรือใบจุดขาวบนใบสับปะรดที่เกิดแผล เนื่องจากการเสียดสีด้วยแรงลมตามธรรมชาติ การแพร่ระบาด เชื้อราเข้าทำลายทางแผลที่เป็นรอยตัดของหน่อพันธุ์ รอยตัดขั้วผล และแผลใบที่เกิดจากการเสียดสีของแรงลม สภาพความชื้นในอากาศสูง สภาพร้อนชื้น ทำให้หน่อสับปะรดเน่าเร็วขึ้น (นิพนธ์, 2542) สปอร์ของเชื้อราอาจเกิดบนซากเหง้าสับปะรด แล้วแพร่กระจายโดยลมไปยังผลสับปะรดที่ยังไม่เก็บเกี่ยว ถ้ามีแผลที่ผลสับปะรด เชื้อโรคจะเข้าทำลายภายใน 8-12 ชั่วโมง การเก็บผลสับปะรดไว้ในที่ควบคุมอุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส จะป้องกันการพัฒนาของเชื้อโรค แต่เมื่อผลสับปะรดกลับเข้าสู่สภาพอุณหภูมิปกติทั่วไปอาการจะเริ่มขึ้นใหม่ (Rohrbach and Schmitt, 1998)

การป้องกันและกำจัด

1) หลังหักหน่อพันธุ์ หรือจุกพันธุ์ ควรฝังลงให้แห้ง หรือตากแดดก่อนรวมเป็นมัด และนำมารวมเป็นกองเพื่อรอปลูก การตากหน่อหรือฝังหน่อให้แห้งด้านรอยหักขึ้น

2) ชุบสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เบน โนมิล (50% ดับบลิวพี) ถ้ามีโรคยอดเน่าระบาด ด้วย การผสมฟอสฟิไทล อะลูมิเนียม หรือใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อรา ไคโฟลาแทน อัตรา 500-1,000 กรัมต่อน้ำ 100 ลิตร หรือ โฟซิริลอะลูมิเนียม อัตรา 250-300 กรัมต่อน้ำ 100 ลิตร ก่อนปลูก หรือพ่น สารเหล่านี้ทันทีหลังปลูก (กรมวิชาการเกษตร, 2546)

8.3 โรครากปม (root knot)

เป็นโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่สับปะรดมากในหลายแปลงปลูก เช่น มลรัฐ ฮาวาย มีการระบาดรุนแรงในปี ค.ศ. 1920-1950 โดยเฉพาะในสับปะรดตอที่ 1 และตอที่ 2 เมื่อเกิด โรครากปมแล้ว จะถูกเชื้อสาเหตุโรคต้นเน่า-รากเน่า เข้าซ้ำเติม (วิชัย และคณะ, 2546) สาเหตุเกิด จากไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne javanica* (Treub) Chetwood ซึ่งอาศัยในดิน และแพร่ระบาด เข้าสู่ทางปลายรากสับปะรด (Caswell *et al.*, 1990)

ลักษณะอาการ ต้นสับปะรดที่มีไส้เดือนฝอยชนิดนี้เข้าทำลาย จะไม่เจริญเติบโต ใบเหลืองซีด เมื่อถอนต้นขึ้นดู จะพบว่าปลายรากบวมเป็นปม รากฝอยถูกทำลาย รากนึ่ม ผลผลิต ลดลง

การแพร่ระบาด ไส้เดือนฝอยอาศัยในดิน และเข้าสู่ต้นสับปะรดทางราก

การป้องกันกำจัด หลีกเลี่ยงการปลูกสับปะรดซ้ำที่เดิม ซึ่งเคยมีการระบาดของ ไส้เดือนฝอย ปลูกพืชหมุนเวียน เช่น ดาวเรือง หรือพืชวงศ์ถั่ว เช่น ถั่วลาย เตรียมดินอย่างประณีต ไถพรวนดิน ตากดินในฤดูแล้งเพื่อทำลายไส้เดือนฝอย หากพบต้นสับปะรดแสดงอาการให้ขุดต้น และรากสับปะรดออกไปเผาทำลายนอกแปลง ก่อนปลูกควรอบดินฆ่าเชื้อด้วยสารนิมาคอน ดี ดี มิก เจอร์ ดีบีซีพี (Nemagon D.D. Mixture DBCP) 2-3 ครั้ง ห่างกัน 7-10 วัน กำจัดวัชพืช และใส่ปุ๋ยตาม คำแนะนำ (นิพนธ์, 2542; วิชัยและคณะ, 2546; Caswell *et al.*, 1990)

8.4 โรคจุดดำในผล หรือ โรคผลย่อยเน่า (fruitlet core rot, black spot)

เกิดจากเชื้อรา *Penicillium funiculosum* Thom หรือ *Fusarium moniliforme* J. Sheld

ลักษณะอาการ โรคจุดดำเกิดกับผลสับปะรดที่เริ่มสุก สีผลจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง แต่ไม่มีความสม่ำเสมอ คล้ายเป็นปื้นสีเขียวแทรกสีเหลืองบนผลสุก เรียกอาการว่า ตาเขียว หรือ green eye เมื่อปอกเปลือกจะพบจุดน้ำตาลถึงสีดำเป็นกลุ่มได้เปลือกที่ไม่เปลี่ยนสี ถ้ามีการผ่าผลตามขวาง จะเห็นเนื้อเยื่อผลย่อยเน่าลงลึกไปในผล เกิดช่องว่างและมีเส้นใยของเชื้อราแทรกผลย่อย ไม่ขยายตัวทำให้ผลบิดเบี้ยว (นิพนธ์; 2542)

การแพร่ระบาด เชื้อราเข้าสู่ผลย่อยทางท่อน้ำหวาน เจริญช้ำๆ ในผลดิบและผลสุก โรคแสดงอาการรุนแรงเมื่อมีไรแดงดูดกิน ทำให้เกิดรอยแผลและรอยแตกเป็นช่องทางให้เชื้อราเข้าสู่ผลสับปะรด

การป้องกันกำจัด ใช้สารป้องกันกำจัดไรแดง เช่น เอ็นโดซัลแฟน ขณะบังคับดอกและอีก 3 สัปดาห์ต่อมา และสารป้องกันกำจัดเชื้อรา เช่น คาร์เบนดาซิม

8.5 โรคเหี่ยว (mealybug wilt)

โรคเหี่ยวสับปะรดมีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งมีความสัมพันธ์กับเพลี้ยแป้ง (pineapple mealybug wilt-associated virus) เป็นไวรัสกลุ่มคลอสเทอโร (closterovirus) มีรูปร่างแบบท่อนยาวคดขนาดประมาณ 12-1,200 นาโนเมตร แพร่กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่อาหารของสับปะรด

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรด ที่พบในฮาวายและแหล่งปลูกอื่นๆ ทั่วโลก มี 2 ชนิด คือ pineapple mealybug wilt-associated virus-1 (PMWaV-1) และ pineapple mealybug wilt-associated virus-2 (PMWaV-2) ต้นสับปะรดที่ได้รับเชื้อ PMWaV-2 จะแสดงอาการโรคเหี่ยว แต่ต้นสับปะรดที่ได้รับเชื้อ PMWaV-1 ไม่จำเป็นต้องแสดงอาการโรคเหี่ยว แต่สังเกตได้จากต้นสับปะรดไม่เจริญเติบโตเหมือนต้นปกติ สภาพเช่นนี้ผลผลิตในสับปะรดต้นปลูกอาจไม่เสียหายมาก แต่ผลผลิตจะลดลงมากในสับปะรดต้นต่อ (Sether and Hu, 2002)

เชื้อคลอสเทอโรไวรัส ตรวจพบมากที่สุด ในเซลล์รากสับปะรดจากต้นที่แสดงและไม่แสดงอาการโรคเหี่ยว โดยการตรวจด้วยวิธี ELISA และ ISEM (Hu *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับ รายงานของ วิชัยและคณะ (2546) เชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว ตรวจพบได้จากเซลล์ของต้นและรากสับปะรด

การแพร่ระบาด ถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยเพลี้ยแป้ง 2 ชนิด คือเพลี้ยแป้งชมพู *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และเพลี้ยแป้งสีเทา *D. neobrevipes* Beardsley เป็นพาหะ โดยมีมดคันไฟ *Solenopsis* sp. และ มดหัวโต *Pheidole* sp. เป็นตัวพาเพลี้ยแป้งเคลื่อนย้ายจากที่เป็นโรคไปยังต้นสับปะรดที่อยู่ข้างเคียงและมีวัชพืชเป็นแหล่งหลบซ่อนอาศัยของมดและเพลี้ยแป้ง (Bos, 1999)

9. การบังคับดอกสับปะรด

การปลูกสับปะรดในประเทศไทย ต้นสับปะรดสามารถออกดอกได้เองตามธรรมชาติ ประมาณเดือนธันวาคม-มกราคม ช่วงเวลาดังกล่าวมีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการออกดอก คืออุณหภูมิ กลางคืน 18-22 องศาเซลเซียส อุณหภูมิกลางวัน 22-34 องศาเซลเซียส ความชื้นในดินและอากาศต่ำ ทำให้การเจริญทางลำต้นลดลง และยังเป็นช่วงวันสั้น การออกดอกในช่วงดังกล่าวจะเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ในเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน (สุภาพร, 2546) การปล่อยให้สับปะรดออกดอกเองตามธรรมชาติ ทำให้การออกดอกไม่พร้อมกัน ไม่มีความสม่ำเสมอ สับปะรดเก็บเกี่ยวได้ไม่พร้อมกัน ไม่สามารถกำหนดปริมาณสับปะรดเพื่อสู่ตลาด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง จะมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมแปรรูป ดังนั้น การบังคับดอกสับปะรดจึงเป็นกระบวนการสำคัญหนึ่งของการผลิตสับปะรดให้ได้ปริมาณและคุณภาพ ตามความต้องการของตลาด โดยคำนึงถึงวัตถุประสงค์หลัก คือ ให้มีผลผลิตในปริมาณที่ต้องการ และการจัดการระบบการผลิตเป็นไปอย่างประสิทธิภาพ (เกลียวพันธุ์, 2551)

การบังคับดอกสับปะรดด้วยการใช้สารเคมี เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด หากปฏิบัติได้ถูกต้องและต้นสับปะรดในแปลงที่จะบังคับออกดอก มีขนาดสม่ำเสมอ น้ำหนักต้นพร้อมจะบังคับดอกได้ คือประมาณ 2.5-3.0 กิโลกรัม ใบสับปะรดมีสีเขียวเข้มอมม่วงแดง จะทำให้สับปะรดออกดอกได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ (เกลียวพันธุ์, 2551)

สารที่ใช้บังคับดอก มี 2 ชนิด คือ

1) เอทธิฟอน (ethephon) จะปลดปล่อย เอธิลีน ethylene แทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช เป็นฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการออกดอกสับประรด เอทธิฟอนชนิดที่มีสารออกฤทธิ์ 39.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้อัตรา 8 มิลลิลิตร ผสมปุ๋ยเคมีสูตร 46-0-0 อัตรา 300 กรัม ผสมน้ำ 20 ลิตร หยอด ยอดสับประรดต้นละ 60-75 มิลลิลิตร

2) แคลเซียมคาร์ไบด์ (CaC_2) คือถ่านแก๊ส ลักษณะเป็นก้อน เมื่อจะใช้ให้ป่นเป็นเม็ดขนาดเล็ก ใช้หยอดที่ยอดสับประรด อัตรา 1-2 กรัมต่อดัน แล้วหยอดน้ำตามประมาณ 50 มิลลิลิตร หรือ หยอดถ่านแก๊สขณะที่มีน้ำอยู่ในยอดสับประรด

ข้อปฏิบัติเพื่อให้การบังคับดอกมีประสิทธิภาพ

1) การหยอดเอทธิฟอน หรือแคลเซียมคาร์ไบด์อย่างใดอย่างหนึ่ง ให้หยอด 2 ครั้ง ห่างกัน 4-7 วัน ถ้ามีฝนตกภายใน 2 ชั่วโมงหลังหยอดสารบังคับดอกควรหยอดซ้ำภายใน 2-3 วัน

2) ทำการบังคับดอกในช่วงเย็นหลังเวลา 18.00 น. หรือกลางคืน

3) ก่อนบังคับดอก ควรเว้นการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างน้อย 1-2 เดือน

4) น้ำที่ผสมสารเคมีบังคับดอก ต้องใสสะอาด เมื่อผสมสารเอทธิฟอนแล้วให้ใช้ทันที ไม่ควรเก็บไว้ข้ามคืน

5) หลังบังคับดอกประมาณ 45-50 วัน สังเกตยอดสับประรดจะออกสีแดง หลังจากนั้น ประมาณ 5 เดือนสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิต (Kerns *et al.*, 1936)

10. การเก็บเกี่ยวผลผลิต และการจัดการต้นตอสับปะรด

การปลูกสับปะรดในประเทศไทย สามารถปลูกได้ตลอดปี จึงมีสับปะรดส่งโรงงานแปรรูป และในตลาดบริโภคสดเกือบตลอดทั้งปี แต่ช่วงที่สับปะรดจะมีผลผลิตมากในรอบปี คือ ระหว่าง เดือน เมษายน – มิถุนายน และระหว่างเดือนตุลาคม – ธันวาคม โดยช่วงต้นปีจะมีผลผลิตมากกว่า ช่วงปลายปี ประมาณ 2-3 เท่า

เนื่องจากการปลูกสับปะรดสามารถบังคับให้ออกดอกได้และได้ผลผลิตตามต้องการ ฉะนั้น การเก็บเกี่ยวผลผลิตจึงปฏิบัติได้ง่ายกว่าสับปะรดที่ปล่อยให้ดอกตามธรรมชาติ ซึ่งไม่มีความ สม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามการเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม ว่ามีความสุกแก่ตามมาตรฐานที่กำหนดสำหรับ สับปะรดส่งโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป และสับปะรดสำหรับบริโภคสด

การพิจารณาความสุกแก่ของผลสับปะรดสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของเปลือกผลมีสี เหลืองจากส่วนของโคนผลไม่เกิน 40-60 เปอร์เซ็นต์ หรือตาเปิดไม่เกิน 4-6 ตา ตาข่อยนูนร่องตาเต็ม กลีบเลี้ยงใต้ผลจะเหี่ยวเป็นสีน้ำตาล ก้านผลมีรอยเส้นตามแนวยาว ผ่าดูเนื้อในผลสับปะรดที่สุกจะ เปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลือง มีรสชาติหวานหอม แต่ลักษณะเหล่านี้ก็แตกต่างกันไปตามพันธุ์

การเก็บเกี่ยวสับปะรด ระยะเก็บเกี่ยวที่เหมาะสม สับปะรดจะเก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลังจาก การใช้สารบังคับดอก 150-160 วัน ซึ่งอาจเร็วกว่านี้หรือช้าออกไปเล็กน้อยขึ้นกับฤดูกาล ซึ่งในช่วง ถูหนาวการแก่ของผลสับปะรดจะล่าช้าออกไปเล็กน้อย ส่วนในฤดูฝนสับปะรดจะสุกแก่เร็วขึ้น อาจอยู่ที่ 140-150 วัน ฉะนั้นเพื่อความแม่นยำในการพิจารณาการสุกของผลสับปะรดด้วยการนับ อายุ จำเป็นต้องจดบันทึกรายละเอียดการปฏิบัติงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งวันที่บังคับดอกครั้งแรก (กรมวิชาการเกษตร, 2545; Collins, 1960)

วิธีการเก็บเกี่ยว กรมวิชาการเกษตร (2545) แนะนำวิธีการปฏิบัติดังนี้

สับปะรดสำหรับส่งโรงงาน ใช้มือหักผลออกจากต้น โดยไม่ต้องเหลือก้าน แล้วหักหรือตัด จุกออก ไม่ควรใช้วิธีบีดจุกจากผล เพราะจะทำให้เกิดรอยแผลซ้ำ เกิดการเน่าเสีย คัดทิ้งผลแกน ผล สับปะรดที่ถูกแดดเผา หรือมีความผิดปกติ เช่นหลายจุก ผลมีรอยดำหนิ ถูกแมลงศัตรูทำลาย คัด ขนาดผลตามมาตรฐานของโรงงานแปรรูป

สับปะรดสำหรับบริโภคสด เก็บเกี่ยวเมื่อตาสับปะรดเริ่มเปิด 2-3 ตา หรือผิวเปลือกเริ่มเป็นสีเหลือง ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้มีดตัดให้เหลือก้านยาวติดผลประมาณ 10 เซนติเมตร ไม่ต้องตัดจุกออก คัดผลที่มีลักษณะรูปทรงดี ผล ไม่มีตำหนิ

การจัดการต้นตอสับปะรด เมื่อเก็บเกี่ยวสับปะรดต้นปลูกหมดแล้ว ต้องดำเนินการจัดการต้นตอโดยเร็ว การได้ต้นตอที่สมบูรณ์จะได้ผลผลิตสูงในฤดูต่อไป เป็นการลดต้นทุนการผลิต ต้นสับปะรดสามารถเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ได้ผลสับปะรดตามขนาดที่โรงงานและผู้บริโภคต้องการ การปฏิบัติรักษาด้านตอสับปะรดมีขั้นตอนดังนี้

- 1) หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ถ้าพบมีการระบาดของโรค ต้องถอนต้นที่แสดงอาการโรคออกไปทำลายนอกแปลง และป้องกันกำจัดมดและเพลี้ยแป้ง ตามคำแนะนำ
- 2) หักหน่อที่เกิดระหว่างการให้ผลผลิตในรุ่นก่อนออกให้หมด เพื่อให้หน่อที่เกิดใหม่มีความสม่ำเสมอ ง่ายต่อการดูแล
- 3) ใช้มีดตัดต้นสับปะรดระดับเหนือดิน 20-30 เซนติเมตร และตัดใบให้เหลือประมาณ 10 เซนติเมตร
- 4) ใช้ดินและใบสับปะรดคลุมดิน เพื่อรักษาความชื้น และป้องกันการงอกของวัชพืช
- 5) ให้ปุ๋ย และน้ำ ตามคำแนะนำการให้ปุ๋ยต้นตอ
- 6) หักหน่อที่เกิดบนต้นออกไปขยายพันธุ์เหลือไว้เฉพาะหน่อดินที่แข็งแรง 1-2 หน่อ

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายเทอดพงษ์ คงสนุ่น
เกิดวันที่	3 ธันวาคม พ.ศ. 2530
สถานที่เกิด	อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	รางวัลงานวิจัยประเภทชมเชย การประชุมวิชาการและ แสดงผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ ๑ มหาวิทยาลัยราช ภัฏสวนสุนันทา มหาวิทยาลัยศิลปากร และ มหาวิทยาลัยกรุงเทพ ในหัวข้อเรื่อง การวินิจฉัยโรคและ พัฒนาดีเอ็นเอตัวตรวจของเชื้อสาเหตุเนื้อแกนใน สับประรด
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับ งานวิจัย ทุน สกว. – อุตสาหกรรม