วิทยานิพนธ์

การเข้าทำลายผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) ของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn และวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว

Infection of *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn on Dragon Fruits (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) and Postharvest Treatments to Control the Disease

นางสาวอารยา ไชยดี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๘

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
ปริญญา

โรคพืช	โรคพืช
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การเข้าทำลายผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) ของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn และวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว

Infection of *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn on Dragon Fruits (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) and Postharvest Treatments to Control the Disease

นามผู้วิจัย นางสาวอารยา ไชยดี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....
(รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....
(อาจารย์วีระณีย์ ทองศรี, วท.ด.)

หัวหน้าภาควิชา ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนงค์นุช สาสนรักกิจ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....
(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ .... **เดือน** .... **พ.ศ.** ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเข้าทำลายผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) ของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn และวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว

Infection of *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn on Dragon Fruits (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) and Postharvest Treatments to Control the Disease

โดย

นางสาวอารยา ไชยดี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ. 2558

อารยา ไชยดี 2558: การเข้าทำลายผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) ของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn และวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สมศิริ แสงโชติ, Ph.D. 96 หน้า

การเกิดโรคผลเน่าของแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ซึ่งได้มาจากจังหวัดนครราชสีมาพบ 4 เปอร์เซ็นต์ จังหวัดสมุทรสาครพบ 14.7 เปอร์เซ็นต์ และจังหวัดเลย ไม่ได้สำรวจการเกิดโรค โดยการจำแนกเชื้อราดังกล่าวใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทางชีวโมเลกุล เชื้อราสามารถเข้าทำลายแก้วมังกรได้โดยตรงและทางแผล กระบวนการเข้าทำลายของเชื้อเริ่มจาก conidia งอก germ tube และสร้าง appressoria ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเชื้อราสามารถแทงผ่านเข้าทำลายพืชได้โดยตรงบริเวณส่วนต่อระหว่างเซลล์และผ่านทางปากใบ ภายในระยะเวลา 3 วันเชื้อราสร้างเส้นใยแผ่กระจายไปทั่วเนื้อเยื่อทั้งภายในเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ บริเวณส่วนผิวที่เริ่มเข้าทำลาย เกิดการสร้างกลุ่มของ conidiophores และ conidia ตามลำดับ การจุ่ม conidia ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถยับยั้งการงอกได้สูงสุด 97.4 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบระยะเวลาเดียวกันกับอุณหภูมิ 51 และ 53 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิของน้ำร้อนและระยะ เวลาการจุ่มที่สูงขึ้น ทำให้การงอก conidia ลดลงแต่ผลแก้วมังกรแสดงความเสียหายเนื่องจากความร้อน

การควบคุมโรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรภายหลังการเก็บเกี่ยว โดยการจุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดโรค 46.5 50.9 และ 55.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B.cactivora* ได้อย่างสมบูรณ์ การจุ่มผลแก้วมังกรในสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้นดังกล่าว ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที หรือสารเคมี difenoconazole ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สามารถควบคุมโรคผลเน่าได้อย่างสมบูรณ์ และการตรวจสารพิษตกค้างผลแก้วมังกร ที่จุ่มในสารเคมี นาน 3 นาที มีค่าเท่ากับ 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน

____________________ ________________________________ _____/_____/_____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Araya Chaidee 2015: Infection of *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn on Dragon Fruits (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) and Postharvest Treatments to Control the Disease. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Somsiri Sangchote, Ph.D. 96 pages.

Disease incidence of fruit rot, caused by *Bipolaris cactivora,* on dragon fruits obtained from Nakorn Ratchasima and Samut Sakorn provinces was at 4 and 14.7% respectively, whereas Loei province was not conducted. This pathogen was identified by its morphological characteristics and confirmed by molecular technique. It infected the fruit directly and through wounds. Conidia germinated and produced appressoria within 3 hours after inoculation under the moist condition at 25ºC. Infection mycelia penetrated through the cell junction and stomatal opening. After 3 days, hypha were extended both intracellular and intercellular, later, conidiophores and conidia were formed on infection area. Dipping conidia of *B. cactivora* in hot water at 55ºC for 5 minutes reduced conidial germination by 97.4 % and no significant difference between 51 and 53ºC. Increasing hot water temperature and dipping periods decreased conidial germination but heat injury started to develop.

Postharvest treatments by dipping in hot water at 51, 53, and 55ºC for 1 minute showed fruit rot at 53.5, 49.1, and 44.8%, respectively. *In vitro*, PDA amended with difenoconazole 37.5 ppm showed complete inhibition of mycelial growth of *B. cactivora*. Dipping the fruits in this chemical at the same concentration for 3 minutes at ambient temperature or hot difenoconazole at 53ºC for 1 minute showed complete control of fruit rot. The chemical residue in the fruits treated with difenoconazole 37.5 ppm for 3 minutes was 0.07 mg/kg after stored at 25 ºC for 5 days.

___________________ ________________________________ _____/_____/______

Student’s signature Thesis Advisor’s signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศิริ แสงโชติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร. วีระณีย์ ทองศรี กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ให้คำแนะนำ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคุณปรีชา – พเยา ภัยนิราศ เจ้าของสวนแก้วมังกรอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์สวนแก้วมังกรในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนพี่ๆ และเพื่อนๆ ชาวโรคพืชทุกคนที่ให้คำแนะนำ เป็นกำลังใจ และช่วยเหลือในการเรียนและทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนงบประมาณที่ใช้ในการวิจัย (ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2557)

ประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ น้องๆ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง

อารยา ไชยดี
มกราคม 2558

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	29
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	87
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	88
ภาคผนวก ข ตารางแสดงผลความแปรปรวนทางสถิติ	91
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	96

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 การสำรวจการเกิดโรค (%) ที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* จากแหล่งปลูกแก้วมังกร 2 แหล่ง 29

2 ปริมาณการยับยั้งการเกิดโรค (%) ผลเน่าแก้วมังกร ที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ภายหลังการจุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 55

3 การเกิดโรคผลเน่า (%) บนผลแก้วมังกรที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาจุ่มด้วยน้ำร้อนร่วมสารเคมี difenoconazole แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข1 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของระยะเวลาการงอก germ tube ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร 92

ข2 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของระยะเวลาการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร 92

ข3 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งการงอก germ tube ภายหลังการจุ่ม conidia เชื้อรา *B. cactivora* ในอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาทีตามลำดับ 93

ข4 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอก germ tube ภายหลังการจุ่ม conidia เชื้อรา *B. cactivora* ในอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาที ตามลำดับ 93

ข5 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งโรคผลเน่าแก้วมังกร ที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ภายหลังการจุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 94

ข6 การเกิดโรคของโรคผลเน่าของแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 94

ข7 ความรุนแรงของโรคผลเน่าของแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 95

ข8 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการเกิดโรคบนผลแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 53°C เป็นเวลา 1 นาที สารเคมี difenoconazole 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที และสารเคมี difenoconazole 37.5 ppm ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 95

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 โรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ไอโซเลต ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 32

2 โรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ไอโซเลต อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร 33

3 โรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ไอโซเลต อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย 34

4 แสดงขนาดของ PCR product เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าบนแก้วมังกร โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และใช้ marker ขนาด 100 bp plus 35

5 แสดง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *B. cactivora* สาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร โดยใช้โปรแกรม Mega5 version 0.3 36

6 ระยะเวลาการงอกและการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร ที่ได้รับการปลูกเชื้อและบ่มในสภาพชื้น เป็นระยะเวลา 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง 38

7 Conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร หลังการปลูกเชื้อเป็นระยะ เวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 400X 41

8 ลักษณะของ germ tube ที่งอกจาก conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* โดยงอกทั้งเซลล์ด้านหัวและด้านท้าย (bipolar germination) หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) 42

9 Conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* ที่ยึดเกาะบนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง มีการย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชบริเวณรอบที่สัมผัสกับ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) 44

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

10 ลักษณะการเกาะยึดของ conidia เชื้อรา *B. cactivora* และมีการย่อยสลายเนื้อเยื่อผิวผลบริเวณรอบที่สัมผัสกับ conidia หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) 45

11 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *B. cactivora* บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 400X และกล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) 47

12 ลักษณะการเจริญและพัฒนาของเชื้อรา *B. cactivora* บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร ด้วยวิธีการ microtome sectioning เนื้อเยื่อมีความหนา 12 ไมครอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 200X 50

13 ผลของการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาทีต่อการงอกและการยับยั้ง (%) ของ conidia เชื้อรา *B. cactivora* 53

14 ประสิทธิภาพของน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในการควบคุมโรคผลเน่าแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ภายหลังการปลูกเชื้อและบ่มในสภาพชื้น เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง 56

15 การเกิดโรคและความรุนแรง (%) ของโรคผลเน่าแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง 58

16 ประสิทธิภาพของสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 0 37.5 75 150 และ 225 ppm โดยวิธี poisoned food technique ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 60

17 ประสิทธิภาพของสารเคมี imazalil ความเข้มข้น 0 250 500 และ 750 ppm โดยวิธี poisoned food technique ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

18 ประสิทธิภาพของสารเคมี prochloraz ความเข้มข้น 0 250 500 และ 750 ppm โดยวิธี poisoned food technique ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 62

19 ประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกร หลังจากการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* และบ่มในสภาพชื้น 18 ชั่วโมง ก่อนจุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 64

20 การเกิดโรคผลเน่า (%) บนผลแก้วมังกรที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* และบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านด้วยวิธีการต่างๆ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน 67

การเข้าทำลายผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) ของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn และวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว

Infection of *Bipolaris cactivora* (Petrak) Alcorn on Dragon Fruits (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose) and Postharvest Treatments to Control the Disease

คำนำ

แก้วมังกร มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose ชื่อสามัญ Pitaya หรือ Dragon fruit เป็นผลไม้ที่เจริญเติบโตและมีต้นกำเนิดในเขตร้อนของประเทศเม็กซิโก และเขตพื้นที่ทางตอนกลางและตอนใต้ของประเทศอเมริกา (Mizrahi *et al.*, 1997) สามารถเจริญเติบโตเป็นต้นและพยุงลำต้นโดยการใช้รากในอากาศ (aerial root) เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมในกลุ่มเกษตรกรประเทศไทย เนื่องจากปลูกง่าย ให้ผลผลิตเร็ว ได้ผลผลิตสูง และได้สมญานามว่าเป็นผลไม้เพื่อสุขภาพ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายอยู่หลายชนิดเช่น โปรตีน โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม วิตามินซี และไฟเบอร์ มีแคลอรีต่ำ เมล็ดของแก้วมังกรอุดมไปด้วยไขมันไม่อิ่มตัวและมีคุณสมบัติต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Smith, 2002)

แก้วมังกรมีบทบาทในเชิงเศรษฐกิจ เป็นผลไม้ที่มีการส่งออก (Valdivia, 2000) และได้รับความนิยมเป็นอย่างสูงโดยเฉพาะในประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ไต้หวัน สิงคโปร์ จีน ฮ่องกง เป็นต้น ประเทศในแถบยุโรป เช่น อังกฤษ ฮอลแลนด์ เป็นต้น ปัจจุบันการผลิตแก้วมังกรยังไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค (Karp, 2002) ในประเทศไทยมีการปลูกกันแพร่หลายทั่วประเทศได้แก่ เชียงราย นนทบุรี นครปฐม ชลบุรี ระยอง จันทบุรี นครราชสีมา และอุบลราชธานี จึงนับได้ว่าแก้วมังกรเป็นพืชที่มีแนวโน้มในการส่งออกได้ค่อนข้างดี เพราะเป็นผลไม้ที่ชาวต่างประเทศรู้จักเป็นอย่างดี (สุรพงษ์, 2540) สำหรับชนิดแก้วมังกรที่นิยมปลูกในประเทศไทยมีอยู่ 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ ชนิดเนื้อขาว และชนิดเนื้อแดง ให้ผลผลิตและคุณภาพสูง ส่วนชนิดเนื้อเหลืองไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากต้นมีความอ่อนแอและให้ผลผลิตต่ำ (เปรมปรี, 2542) แต่ในปัจจุบันมีการระบาดของโรคพืช ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตแก้วมังกรลดลงและได้รับความเสียหายมาก เกษตรกรบางรายจำเป็น

ต้องทิ้งสวนให้ร้างหรือรื้อถอน เนื่องจากไม่สามารถป้องกันกำจัดโรคได้ พรพิมล และคณะ (2550) รายงานการสำรวจโรคแก้วมังกรจากแหล่งปลูกแก้วมังกรในจังหวัด เชียงราย พะเยา ระยอง ราชบุรี และสมุทรสาคร พบโรคของแก้วมังกรได้แก่ โรคเน่าเปียกที่ดอก เกิดจากเชื้อรา *Choanephora* โรคแอนแทรคโนสที่ผล เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โรค stem canker เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella* sp. และโรคแอนแทรคโนสบนลำต้น เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* He *et al.* (2012) รายงานการพบโรคผลเน่าและลำต้นเน่าของแก้วมังกรที่ส่งออกจากประเทศเวียดนามไปยัง Kunming และ Yunnan ของประเทศจีน โรคดังกล่าวเกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* อาการของโรคระยะแรกจะมีอาการฉ่ำน้ำเล็กน้อย เนื้อเยื่อเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลฟางข้าว พบ conidia เชื้อเป็นผงสีดำและผลเน่าในภายหลัง ซึ่งมีรายงานว่าพบในประเทศอิสราเอลเช่นกัน (Israel *et al.* 2011) ถึงแม้มีรายงานโรคนี้ในประเทศไทยไม่มาก แต่ก็มีความเป็นได้สูงที่จะมีการแพร่ระบาด เนื่องจากสภาพอากาศของประเทศไทยเป็นเขตร้อนชื้นเช่นเดียวกับเวียดนาม เหมาะสมต่อการเจริญ ขยายพันธุ์และแพร่ระบาดของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* จึงต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อสาเหตุโรค รวมทั้งการเข้าทำลายเพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมโรคไม่ให้แพร่ระบาดต่อไป

วัตถุประสงค์

1. จำแนกชนิดของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* สาเหตุโรคผลเน่าบนผลแก้วมังกร โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวโมเลกุล

2. ศึกษาการเข้าทำลายและการเกิดโรค

3. ศึกษาการใช้น้ำร้อน สารเคมี และสารเคมีร่วมกับน้ำร้อน เพื่อการควบคุมโรคของแก้วมังกรภายหลังการเก็บเกี่ยว และการวิเคราะห์สารตกค้าง

การตรวจเอกสาร

แก้วมังกร (Pitaya หรือ Dragon fruit)

ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose ต้นกำเนิดอยู่ในประเทศเม็กซิโกและเขตพื้นที่ทางตอนกลางและตอนใต้ของประเทศอเมริกา (Mizrahi *et al.*, 1997) ชื่อภาษาอังกฤษส่วนใหญ่เรียก Dragon fruit หรือ Night-blooming cereus หรือ Strawberry pear แตกต่างกันออกไปตามลักษณะการบานของดอกและผลเป็นหลัก (กาญจนา, 2548) มีการสันนิษฐานว่า เมื่อ 100 กว่าปีที่แล้ว ชาวฝรั่งเศสได้นำเมล็ดแก้วมังกรมาจากประเทศในแถบอเมริกากลางมาปลูกที่ประเทศเวียดนาม ชาวเวียดนามจึงถือว่าเป็นพืชท้องถิ่น และเรียกว่า Thanh Loy หรือ Green Dragon ซึ่งเป็นคำนิยามของแก้วมังกรที่มีสีเขียวตอนยังไม่สุกแก่ และผลมีกลีบสีเขียวคล้ายครีบของมังกร เป็นที่นิยมปลูกกันมากในกลุ่มเกษตรกรประเทศเวียดนาม และได้แพร่ไปยังประเทศอื่นๆ ข้างเคียง เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย ไต้หวันและญี่ปุ่น เป็นต้น สำหรับประเทศไทยนิยมปลูกในจังหวัดเชียงราย นนทบุรี นครปฐม ชลบุรี ระยอง จันทบุรี นครราชสีมา และอุบลราชธานี (สุรพงษ์, 2540) โดยชนิดที่นิยมปลูกมีดังนี้

1. ชนิดเนื้อขาวเปลือกแดง

ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton and Rose เปลือกสีชมพูสด ปลายกลีบสีเขียว รสหวานอมเปรี้ยวหรือหวานจัด ลำต้นเป็นท่อนๆ หรือข้อยาวสีเขียว มี 3 แฉกเป็นส่วนใหญ่ ลำต้นใหญ่ขนาด 4.0-7.5 เซนติเมตร สันของแฉกแข็งและเป็นหยัก มีหนามแข็งซึ่งทำหน้าที่คล้ายตาข้าง มีคุณสมบัติของเนื้อเยื่อเจริญ นอกจากนี้ยังให้กำเนิดดอกและกิ่งใหม่ได้ โดยมีเนื้อเยื่ออวบน้ำหุ้มอยู่รอบนอกเป็นเนื้อเยื่อสะสมน้ำ อาหาร เกลือแร่ ธาตุต่างๆ รวมทั้งสารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ดอกมีลักษณะคล้ายแตร มีสีขาวหรือสีตองอ่อน ผลมีผิวสีแดงบานเย็น บางส่วนปกคลุมด้วยกลีบผลสีเขียว เนื้อมีสีขาว รูปทรงกลมรี หรือรูปไข่ อาจมีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่ถึง 12 เซนติเมตร พบในอเมริกาเขตร้อนและปลูกกันมากในเขตร้อน

2. ชนิดเนื้อแดงเปลือกแดง มีอยู่หลายชนิดได้แก่

1.1 *Hylocereus escuintlensis* Kimnach หรือชนิดเอสคิวอินทเลนซีส เนื้อผลมีสีแดง ลำต้นสีเขียวเข้ม ยาวได้มากกว่า 5 เมตร กลีบดอกแคบดูคล้ายสามเหลี่ยม กลีบรวมด้านนอกมีสีเขียวเหลือง บางครั้งเจือสีเลือดนกอมน้ำตาล กลีบรวมด้านในมีสีขาวครีม ผลทรงไข่สีแดงม่วงขนาด 9 × 6.5 เซนติเมตร มีกลีบงอกลับ เนื้อสีขาวหรือสีชมพูอ่อน (บางแห่งสีแดงเข้ม) ออกดอกง่ายกว่าสปีชีส์อื่นๆ พบในกัวเตมาลา

1.2 *Hylocereus monacanthus* (Lem.) Britt. & Rose. หรือชนิดโมนาแคนธัส มีหนามขนาดเล็ก แหลมคม กลีบดอกมีขนาดใหญ่ กลีบรวมด้านนอกเจือสีเขียว ส่วนด้านในสีขาว เป็นชนิดที่ออกดอกดกกว่าชนิด *H. escuintlensis* แต่ติดผลยากกว่า พบในโคลัมเบียและปานามา

1.3 *Hylocereus costaricensis* (Weber) Britt. & Rose. หรือชนิดคอสตาริกา เปลือกสีแดงจัด ผลเล็กกว่าพันธุ์เนื้อขาวเปลือกแดง แต่รสหวานกว่า ต้นมีสีเทาอมน้ำเงิน สันของแฉกไม่แข็ง มักจะตรงและหยักตื้นๆ หนามอ้วนสั้นสีน้ำตาล ดอกตูมมีสีม่วงแซมแดง บานตอนกลางคืนจะได้กลิ่นหอมไกล 5-6 เมตร กลีบรวมด้านนอกเจือสีแดง กลีบรวมด้านในสีขาว ผลมีขนาด 10 เซนติเมตร ทรงรูปไข่สีแดงเลือดหมู (บางแห่งทรงผลค่อนข้างกลมแป้น) ถิ่นกำเนิดอยู่ที่คอสตาริกา

1.4 *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britt. & Rose หรือชนิดโปลี่ไรซัส ลำต้นเรียว 3 แฉก ต้นอ่อนออกสีขาวต่อมาเป็นสีเขียว หนามมีสีน้ำตาล มีหนามคล้ายขน หลุดได้ง่าย ดอกตูมมีสีม่วง กลีบดอกรูปไข่โดยขอบมีสีแดงหรือสีม่วง กลีบรวมด้านนอกสีแดงส่วนด้านในสีขาว พบในปานามาตลอดไปถึงเอกวาดอร์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

แก้วมังกรจัดเป็นไม้เลื้อย วงศ์เดียวกับตะบองเพชร สกุล Hylocereanea อยู่ในกลุ่มพืชวันยาวเนื่องจากแสงสว่างเป็นปัจจัยจำกัด โดยต้องการแสงมากกว่า 8 ชม. ต่อวัน (Chau, 1998) และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนระบายน้ำดี พืชตระกูลนี้มีลักษณะพิเศษทางโครงสร้างที่ช่วยในการป้องกันการสูญเสียน้ำเช่น การเปลี่ยนแปลงใบเป็นหนามตามลำต้น การเปลี่ยนแปลงกรดคล้ายกับพืชในวงศ์คราสซูเลี่ยน เรียกแบบย่อๆ ว่า “CAM” ซึ่งปากใบจะปิดตอนกลางวัน และเปิดในตอน

กลางคืนทำให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี สูญเสียน้ำน้อยกว่าพืชอื่นๆ 5-10 เท่า ทนความแห้งแล้งได้ดีกว่าพืชอื่น (สุรพงษ์, 2540) สามารถเจริญเติบโตได้บนต้นไม้หรือก้อนหิน เจริญเติบโตเร็ว และเจริญได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.5-6.5 (Nerd and Mizrahi, 1997)

ราก มี 2 ประเภทคือ รากบนดิน เป็นรากพิเศษที่ช่วยในการพยุงลำต้น ดูดซับความชื้นทั้งในอากาศและน้ำ และรากที่เจริญใต้ดิน เป็นรากที่ใช้ในการดูดซับอาหารและน้ำที่อยู่ในดิน

ลำต้น มีสีเขียวเข้ม ยาวประมาณ 5 เมตร เป็นรอยหยักตรงขอบมีหนามเป็นกระจุกตามข้อ ข้อละ 3-4 เส้น สามารถแตกรากเป็นกลุ่มสีขาว 3-4 ราก เมื่อแก่รากจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน ลำต้นแบ่งออกเป็น 3 แฉก ลำต้นจริงมีลักษณะเป็นแกนกลางสีน้ำตาล มีเนื้อเยื่ออวบน้ำหุ้มอยู่รอบนอก เพื่อทำหน้าที่ในการสะสมอาหาร น้ำ และเกลือแร่ต่างๆ รวมทั้งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงด้วย

ดอกแก้วมังกรมีสีขาว เริ่มบานตอนกลางคืนเวลาประมาณ 19.00 น. จนถึง 23.00 น. รังไข่มีขนาดใหญ่ใต้วงกลีบ (inferior ovary) มีฐานรองดอกที่หนาล้อมรอบรังไข่ จัดเป็นดอกเดี่ยวรูปร่างคล้ายระฆัง ซึ่งประกอบด้วยเกสรตัวผู้สีเหลืองอ่อนจำนวนมากกว่า 500 อันขึ้นไป มี style 1 อัน และเกสรตัวเมียลักษณะกลม สีเขียวอ่อนปลายเป็นแฉกแยกจากกัน มากกว่า 10 แฉก กลีบดอกจะอยู่บนรังไข่ (Gibson and Nobel, 1986) โดยลักษณะทางชีววิทยาของดอก แบ่งเป็น 4 ระยะ คือ ดอกตูม ดอกแรกแย้ม ดอกบานเต็มที่ และดอกหุบ

ผลแก้วมังกรมีรูปทรงเป็นทรงกลมรี สีของเปลือกผลเมื่อดิบเป็นสีเขียว เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีแดงม่วงหรือสีบานเย็น มีกลีบเลี้ยงสีเขียวติดอยู่รอบผล (นิดดา และทวีทอง, 2550) ส่วนใหญ่มีน้ำหนักประมาณ 300-600 กรัม เมื่อผ่าผลแก้วมังกรจะเห็นเนื้อของผลแก้วมังกรสีขาวหรือสีแดงขึ้นอยู่กับสปีชีส์ โดยมีเมล็ดสีดำเล็กคล้ายๆ เมล็ดงา หรือเมล็ดแมงลัก กระจายฝังอยู่ทั่วเนื้อ

ประโยชน์ของแก้วมังกร

แก้วมังกร มีประโยชน์เป็นสมุนไพรโดยพืชพวกกระบองเพชรจะมีสาร mucilage จำนวนมาก ซึ่งเป็นสารพวก complex polysaccharides ลักษณะเป็นวุ้นเหลว มีคุณสมบัติในการดูดน้ำ Mizrahi *et al.* (1997) รายงานว่า มีการใช้ลำต้น ดอก และผลของพวกกระบองเพชรในการบริโภค ช่วยปรับปรุงการควบคุมน้ำตาลกลูโคสในคนที่เป็นโรคเบาหวาน สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส และเพิ่มฤทธิ์ของอินซูลินภายใต้สภาวะน้ำตาลในเลือดสูง สามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์และคลอเรสเตอรอลทั้งหมด โดยเน้นการลดไลโปโปรตีน-คลอเรสเตอรอลชนิดความหนาแน่นต่ำในเลือด นอกจากนี้ผลแก้วมังกรยังมีธาตุเหล็ก ช่วยบรรเทาโรคโลหิตจางและแก้วมังกรผิวทองยังมีสาร captine ที่ช่วยบำรุงหัวใจ (Jacobs, 1999)

คุณค่าทางอาหาร

ผลแก้วมังกร มีสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากมายเช่น ใยอาหาร วิตามิน โปรตีน และแร่ธาตุต่างๆ ดังสรุปไว้ในตาราง

ตารางแสดงส่วนประกอบของผลแก้วมังกรต่อส่วนที่บริโภคได้ 100 กรัม

ส่วนประกอบ	**ปริมาณ**
ความชื้น	85.30 g
โปรตีนรวม	1.10 g
ไขมัน	0.57 g
กลูโคส	5.70 g
ฟรุคโทส	3.20 g
ซอร์บิทอล	0.33 g
คาร์โบไฮเดรต	11.20 g
เส้นใย	1.34 g
พลังงาน (กิโลแคลอรี่)	67.70 g
วิตามินซี	3.0 mg
วิตามินเอ	0.01 mg
ไนอาซิน	2.8 mg
แคลเซียม	10.2 mg
เหล็ก	3.37 mg
แมกนีเซียม	38.9 mg
ฟอสฟอรัส	27.5 mg
โพแทสเซียม	272.0 mg
โซเดียม	8.9 mg
สังกะสี	0.35 mg

ที่มา: To *et al.* (2000)

แก้วมังกร เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศร้อน อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ย 500-1500 มิลลิเมตร แก้วมังกรต้องการแสงแดด ทนต่อความแห้งแล้ง อุณหภูมิสูง และสภาพดินที่ไม่ดี โดยทั่วไปแก้วมังกรเป็นพืชที่ทนต่อโรค อย่างไรก็ตามสภาพอากาศในปัจจุบันมีการเปลี่ยนแปลงไปมาก อุณหภูมิเฉลี่ยระหว่างวันสูงขึ้น ความชื้น ปริมาณน้ำฝนมีการเปลี่ยนแปลง เกิดลมพายุบ่อยครั้งและมีความรุนแรงขึ้น ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่เหมาะต่อการเจริญเติบโต ขยายพันธุ์และแพร่ระบาดของเชื้อสาเหตุโรคพืชทำให้แก้วมังกรได้รับความเสียหาย ผลผลิตลดลง ส่งผลให้การส่งออกลดลงด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยด้านอื่นๆ ที่เข้าทำลายผลผลิตแก้วมังกรได้เช่น แมลง เพลี้ย เป็นต้น

ศัตรูของแก้วมังกร มีทั้งที่เป็นวัชพืชและโรคพืช แมลงต่างๆ ที่สำคัญคือมดคันไฟ เกษตรกรจะต้องป้องกันและกำจัดก่อนปลูกแก้วมังกร นอกจากนี้ยังพบพวกหนอนคืบ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย หนอนผักบุ้งบ้างเล็กน้อย ด้วงค่อม และพวกหอยในบางสถานที่ ซึ่งศัตรูและแมลงเหล่านี้จะกินส่วนที่เป็นต้นอ่อนของแก้วมังกร อาจเป็นยอดอ่อนหรือเปลือกผลอ่อน ส่วนพวกนก หนูจะชอบกินผลแก่ ในประเทศเวียดนามได้มีรายงานความเสียหายของผลแก้วมังกรที่ถูกแมลงวันผลไม้เข้าทำลาย Thuy and Duc (1999) รายงานว่า ในประเทศเวียดนามพบแมลงวันผลไม้ 11 ชนิดเข้าทำลายผลไม้สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งพบในทางตอนใต้ของประเทศ ชนิดที่พบบ่อยได้แก่ *Bactrocera correcta, B. cucurbitae* และ *B. dorsalis* โดยประเทศไทยยังไม่มีรายงานความเสียหายจากแมลงวันผลไม้ดังกล่าว แต่จะพบโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับแก้วมังกรได้แก่ โรครากเน่า โคนเน่า และกิ่งเน่าในส่วนที่อวบน้ำ ผิวกิ่งเป็นจุดหรือปื้นสีน้ำตาล กิ่งเหลือง ปลายยอดเหลือง เป็นต้น

โรคผลเน่าของแก้วมังกร

พรพิมล และคณะ (2550) รายงานการสำรวจโรคแก้วมังกรจากแหล่งปลูกแก้วมังกรในจังหวัด เชียงราย พะเยา ระยอง ราชบุรี และสมุทรสาคร พบโรคของแก้วมังกรได้แก่ โรคเน่าเปียกที่ดอก เกิดจากเชื้อรา *Choanephora* sp. โรคแอนแทรคโนสที่ผล เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum* sp. โรค stem canker เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella* sp. และโรคแอนแทรคโนสบนลำต้น เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Taba *et al.* (2007) รายงานว่า ในปี 2007 พบโรคผลเน่าของแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ในโรงเรือนหลังการเก็บเกี่ยวที่เมือง Itoman จังหวัด Okinawa ประเทศญี่ปุ่น และมีรายงานว่า *Drechslera cactivora* เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูล Cactaceae ซึ่งระบาดในประเทศแถบยุโรปและอเมริกา (Durbin *et al.*, 1955; Taba *et al.*, 2007)

ลักษณะอาการ

โรคผลเน่าของแก้วมังกร จะแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 2-3 วัน อาการระยะแรกมีลักษณะเป็นแผลจุดวงกลม ขนาดเล็ก เนื้อเยื่อเปลี่ยน เป็นสีน้ำตาลอ่อนและฉ่ำน้ำ หลังจากนั้นแผลจะขยายใหญ่ขึ้นและใน 5-7 วันจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำ ซึ่งเป็นส่วนที่เชื้อราสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์เรียก conidia (He *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังเกิดโรคกับส่วนของต้นแล้วเชื้อลุกลามไปถึงดอกของแก้วมังกร (Tarnowski *et al.*, 2010) ส่งผลให้ลำต้นเจริญเติบโตไม่เต็มที่ ผลแคระแกร็น และผลผลิตที่ได้ก็ลดต่ำลงไปด้วยตามลำดับ

เชื้อราสาเหตุโรค

โคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน มีสีเขียวมะกอกถึงสีเทาดำ เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 9 เซนติเมตร เส้นใยเจริญอยู่บนอาหาร ด้านใต้วุ้นอาหารมีสีดำ เจริญได้ดีทั้งบนอาหาร PDA, MEA และ V8 agar conidiophore มีสีอ่อนถึงสีน้ำตาลอ่อน ตั้งตรงหรือโค้งเล็กน้อย อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ที่ส่วนฐานและที่ปลายมักโป่งมีขนาด 65.5-220 x 3.5-9.5 ไมครอน และมักพบกลุ่มของ conidiophores อยู่รวมกันเป็นกลุ่มบนแผลที่ผลแก้วมังกร conidia มีรูปร่างรีตรงกลางกว้าง รูปร่างคล้ายกระสวย หรือคล้ายกระบอง มี 2-4 pseudosepta สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลทอง ขนาด 20-54 x 6 -11 (ค่าเฉลี่ย 34.75 x 7.28) ไมครอน ที่ปลายมี hilum ยื่นออกมา พบการงอกจากเซลล์หัวท้าย (bipolar germination) เชื้อรา *B.cactivora* ทำให้เกิดโรคกับพืชในวงศ์ Cactaceae (Ellis, 1971; Alcorn, 1983) สำหรับโรคผลเน่าของแก้วมังกรนั้น มีรายงานพบโรคนี้ที่ประเทศไต้หวัน โดย Wang and Lin (2005) ศึกษาโรคลำต้นเน่าของ peanut cactus สีเหลือง และผลเน่าของแก้วมังกร พบว่าสาเหตุของโรคทั้ง 2 ชนิดเกิดจากเชื้อราชนิดเดียวกันคือ เชื้อรา *B. cactivora* ส่วนใหญ่พบว่า conidia งอกจากเซลล์หัวท้าย และได้ศึกษาพืชอาศัยของเชื้อชนิดนี้ พบพืชอาศัยในวงศ์ Cactaceae และพืชชนิดอื่น ได้แก่ *Astrophylum asterias, Cereus jamacaru, Echinocactus grusonii, Echinocereus chloranthus, Echinopsis calochlroa, Espostoa melanostele* และ *Hylocereus* sp. (เนื้อสีแดง) Taba *et al.* (2007) ศึกษาโรคผลเน่าของแก้วมังกรหลังการเก็บเกี่ยวที่เมือง Itoman Okinawa Prefecture ในปี 2006 พบว่า *B. cactivora* เป็นเชื้อราสาเหตุโรค ซึ่งมีลักษณะอาการแตกต่างจากโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* He *et al.* (2012) รายงานการพบโรคผลเน่าของแก้วมังกรในผลแก้วมังกรที่ส่งออกจากประเทศเวียดนามไปยัง Kunming และ Yunnan ของประเทศจีน

อนุกรมวิธานของเชื้อสาเหตุโรค

Kingdom: Fungi
Division: Ascomycota
Subdivision: Pezizomycotina
Class: Dothideomycetes
Subclass: Pleosporomycetidae
Order: Pleosporales
Family: Pleosporaceae
Genus: Bipolaris (Alcorn, 1983)

การจำแนกเชื้อราชนิดของเชื้อราโดยใช้ลักษณะทางชีวโมเลกุล

ดีเอ็นเอ เป็นสารพันธุกรรมที่สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้ โดยดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) เป็นสิ่งที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี ถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่รู้จักกันว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการจำแนก (identification) และอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของสิ่งมีชีวิต (Weising *et al.*, 1995) ดีเอ็นเอเครื่องหมายแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ polymerase chain reaction (PCR) (Weising *et al.*, 1995) โดยแต่ละวิธีมีหลักการดังนี้

DNA-DNA hybridization

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) การตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่แยกได้จากแบคทีเรีย บริเวณตำแหน่งตัดจำเพาะที่เรียกว่า ตำแหน่งจดจำ ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างหรือมีความหลากหลาย ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบสจำนวน 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นถ้าใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ แล้วตรวจสอบด้วย probe ที่สามารถ hybridize ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อนำดีเอ็นเอมาจากแหล่งที่ต่างกันหรือเปลี่ยน

โครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง แล้วมาตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต่างกันเรียกว่า polymorphism

Polymerase chain reaction (PCR)

1. SSR (Simple Sequence Repeats) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Co-dominant สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ ซึ่งมีความเสถียรสูง (stability) และสามารถทำซ้ำ (reproducibility) ได้ ข้อดีของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้คือ ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและ polymorphic สูงจึงสามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสออกจากกันได้ จำนวน primer ที่ใช้มีมากและเนื่องจากใช้ใน PCR จึงใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นในปริมาณที่น้อย นอกจากนี้การแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสของ primer ระหว่างนักวิจัยทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาเกี่ยวกับแผนที่โครโมโซม และพันธุศาสตร์ประชากร SSR ยังเคยใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของประชากรกลุ่มย่อยในมนุษย์ด้วย (Weising *et al.*, 1995)

2. RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA) เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR โดยใช้ random primer (arbitrary primer) เพียงชนิดเดียว เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสบริเวณใดเลย primer จะมีลักษณะสั้นกว่าปกติ ประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ โดยสามารถเข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้า primer เกาะในทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิต PCR แต่หากเกาะในบริเวณที่ใกล้เคียงกัน และมีทิศทางที่เข้าหากันจะเกิดผลผลิต PCR เมื่อนำผลผลิต PCR มาแยกโดย electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ก็จะได้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Weising *et al.*, 1995)

3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นเทคนิคที่ผสมผสานระหว่าง polymerase chain reaction (PCR) และ DNA-DNA hybridization โดย polymorphism จะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของลำดับเบสบริเวณที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ additional base และตรวจสอบด้วย PCR ความยาวและความจำเพาะของ primer ที่ใช้ตลอดจน PCR condition ที่เหมาะสม จะได้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้จำนวน amplified fragment มีมาก ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของจีโนม ความถี่ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และจำนวนเบสที่จับกับ PCR primer ดังนั้น AFLP จึงมี

ความเหมาะสมที่จะใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อจำแนกชนิดและศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตที่มีสปีชีส์ที่แตกต่างกันและสปีชีส์ภายในกลุ่มเดียวกัน (Vos *et al.*, 1995)

4. sequence analysis เป็นปฏิกิริยาเคมีที่ถูกค้นพบโดย Sanger *et al.* (1977) เรียกว่า Sanger method หรือ dideoxy or chain-terminating method ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบัน โดยจะใช้เครื่อง automated DNA sequencer เป็นตัวอ่านรหัสพันธุกรรม หลักการถอดรหัสพันธุกรรมจะอาศัยการเพิ่มปริมาณของ DNA ในหลอดทดลอง (polymerase chain reaction, PCR) แต่มีการยับยั้งการสังเคราะห์สาย DNA ที่ตำแหน่งของ base (A T C หรือ G) อย่างจำเพาะเจาะจง ในปฏิกิริยาดังกล่าวจะเตรียมคล้ายกับ PCR ปกติ แต่จะมีการเติมสารเคมี dideoxynucleotides, ddNTPs: ddATP aaTTP ddCTP ddGTP) เพื่อเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังใช้ primer หรือ ddNTPs ที่ถูก labeled ด้วยสาร fluorescent เพื่อความสะดวกในการอ่านผลด้วยเครื่อง automated DNA sequencer จะได้ DNA ที่มีขนาดสั้นยาวแตกต่างกัน เมื่อนำสาย DNA เหล่านี้ไปแยกขนาดในสนามกระแสไฟฟ้า โดยเครื่อง automated DNA sequencer จะได้รูปแบบของสาย DNA ที่มีการเรียงลำดับตามขนาดความยาวของ DNA fragment ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรหัสพันธุกรรมบนสาย DNA ข้อมูลที่ได้คือสายรหัสพันธุกรรมของนิวคลีโอไทด์ A T C G แสดงความหมายของนิวคลีโอไทด์แต่ละตัว โดยสายรหัสพันธุกรรมเหล่านี้อาจเป็นส่วนที่กำหนดการสร้างโปรตีนหรือเป็นส่วนที่ไม่ได้กำหนด การสร้างโปรตีนก็ได้ ขึ้นอยู่กับชิ้นส่วนของ DNA ที่นำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ หากชิ้นส่วน DNA เป็น genomic DNA ก็จะพบส่วนของ exon และ intron แต่หากนำเอา RNA หรือ cDNA มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ก็จะพบเฉพาะส่วนของ exon เท่านั้น ซึ่งประกอบด้วยรหัสพันธุกรรม (genetic code) ที่กำหนดการสร้างกรดอะมิโน โดยทั่วไปแล้วข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลก จะถูกนำไปเก็บไว้ที่ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของ National Center For Biotechnology Information (NCBI) ที่เรียกว่า Genbank

การควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกรภายหลังการเก็บเกี่ยว

วิธีการป้องกันและควบคุมโรคที่เกิดภายหลังการเก็บเกี่ยวนั้น ต้องปฏิบัติตั้งแต่ช่วงระหว่างการเก็บเกี่ยวจนกระทั่งภายหลังการเก็บเกี่ยว โดยลดการกระทำที่ทำให้เกิดการบอบช้ำหรือพยายามให้เกิดแผลน้อยที่สุด การเก็บรักษาผลผลิตไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยการเก็บไว้ในห้องเย็น การจุ่มสารเคมีเพื่อชะลอการเน่าเสีย การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ผสมในน้ำที่ใช้ล้างผลผลิต

และการล้างผลผลิตเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนหรือดินออก เหล่านี้เป็นวิธีการปฏิบัติจะช่วยลดความสูญเสียของผลผลิตที่เกิดจากโรคพืชภายหลังการเก็บเกี่ยวได้ (ประเทือง, 2538)

1. การใช้สารเคมี

สารเคมีประมาณ 20 ชนิดได้มีการใช้ในระยะ 30 กว่าปีที่ผ่านมากับผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งสารเหล่านี้จะใช้ได้ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับความไวของเชื้อต่อสารเคมี ความสามารถในการซึมลงไปในผิวของสารเคมีเพื่อไปกำจัดเชื้อ นอกจากนี้สารเหล่านี้ต้องไม่ทำให้เกิดความเสียหายกับผลิตผล และมีพิษตกค้างไม่เกินกว่าแต่ละประเทศกำหนด (Eckert and Ogawa, 1985) การใช้สารเคมีในการป้องกันโรคหลังการเก็บเกี่ยวนั้น เพื่อป้องกันผลไม้จากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ หรือระงับการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (Eckert and Sommer, 1967) สำหรับสารเคมีที่นิยมใช้กับผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้มีหลายชนิด เช่น thiabendazole, carbendazim, iprodione, mancozeb, azoxystrobin, imazalil และ prochloraz (Brent and Hollomon, 2007)

Imazalil เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่สามารถใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้ดี มีผลต่อการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งเป็น sterol หลักที่ทำหน้าที่สำคัญของผนังเชื้อราหลายชนิด ดังนั้นเมื่อ ergosterol ถูกรบกวนจะทำให้ระบบการควบคุมการเคลื่อนที่ผ่านผนังเซลล์ของสารประกอบต่างๆ รวมทั้งไขมันมีความผิดปกติ และยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ควบคุมการเคลื่อนย้ายของสารผ่านเข้าออกจากเซลล์ (Demel and de Kruyff, 1976) imazalil เป็นสารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) เมื่อฉีดพ่นลงบนพืชแล้วจะถูกดูดซึมเข้าไปภายในเนื้อเยื่อพืช และสามารถเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของพืชได้ สามารถควบคุมเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้ดี ซึ่งเชื้อราชนิดนี้ต้านทานต่อสารเคมี benomyl และ thiabendazole Spalding (1982) รายงานการใช้สารเคมี imazalil ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm นาน 2 นาที สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gleosporioides* และโรค stem end rot ที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis citri* ของมะม่วงพันธุ์ Tommy Atkins และ Keitt ได้ดีกว่าสารเคมี thiabendazole thiophanate methyl สุจิรา (2543) ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี imazalil ที่ความเข้มข้น 250, 500, 750, และ 1,000 ppm ในการควบคุมโรคผลเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae, Colletotrichum gloeosporioides, Phomopsis* sp. พบว่า สารเคมี imazalil ทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราทั้ง 3 ชนิด และ imazalil ยังสามารถยับยั้งการงอก conidia ของเชื้อรา *L. theobromae* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

Prochloraz สารเคมีในกลุ่ม imidazole ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ imazalil มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวและยับยั้งเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes และ imperfect fungi โดยมีผลยับยั้ง fatty acid, ergosterol ทำหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อรา ดังนั้นจึงสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา เชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ prochloraz สามารถควบคุมได้เช่น *Gloeosporium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Phoma* spp. และ *Colletotrichum* spp. เป็นต้น (Danderson, 1986) Denner *et al.* (1997) รายงานว่าการจุ่มมันฝรั่งลงใน prochloraz อัตรา 2, 4, 6 กรัมต่อลิตร ก่อนการปลูก 28 วันสามารถลดการเกิดโรค silver scurf มันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อรา *Helminthosporium solani* ได้โดยพบว่าการใช้ prochloraz ที่ความเข้มข้นสูงจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ Danderson (1986) รายงานการจุ่มผลอโวกาโดใน prochloraz ความเข้มข้น 500 ppm นาน 5 นาที พบว่าสามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Colletotrichum* spp. และโรค stem rot ที่เกิดจากเชื้อราในกลุ่ม *Dothiorella* spp. ได้เป็นอย่างดี ศรายุทธ (2556) ทดสอบการใช้สารเคมี prochloraz ที่ความเข้มข้น 400 ppm พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Dothiorella dominicana* สาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกรได้ 95.7 เปอร์เซ็นต์ เมื่อฉีดพ่นในสภาพแปลงปลูกแก้วมังกรก่อนการเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์พบการเกิดโรคผลเน่าเพียง 28 เปอร์เซ็นต์ และการจุ่มผลแก้วมังกรใน prochloraz ความเข้มข้น 400 ppm เป็นเวลา 3 นาทีหลังการเก็บเกี่ยว สามารถควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกรได้อย่างสมบูรณ์

Difenoconazole สารเคมีในกลุ่ม triazole เป็นสารเคมีชนิดดูดซึม (systemic fungicide) เมื่อฉีดพ่นลงบนพืชแล้วสามารถเคลื่อนย้ายไปยังส่วนต่างๆ ของต้นพืชได้ เป็นสารเคมีที่ทั้งใช้ในการรักษาและป้องกันโรคพืช นำไปใช้โดยการฉีดพ่นทางใบหรือคลุกเมล็ดโดยตรง สามารถควบคุมเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes, basidiomycetes และ imperfect fungi ได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งเป็นสาเหตุโรคที่เกิดในดิน บนใบ และเมล็ดพันธุ์พืช เช่น ธัญพืช ถั่วเหลือง ข้าว องุ่น แอปเปิล มันฝรั่งและผัก difenoconazole ส่งผลในการรบกวนการสังเคราะห์ ergosterol โดยจะไปยับยั้ง C-14-demethylation ของ sterol ที่เป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน และการทำงานเปลี่ยนแปลงไป (European Food Safety Authority, 2012) Reuveni *et al.* (2002) รายงานการฉีดพ่นสารเคมี difenoconazole polyoxin B และ azoxystrobin ในสวนแอปเปิล ระยะที่ดอกเริ่มบานจนถึงติดผล พบว่า difenoconazole มีประสิทธิ- ภาพในการลดจำนวนผลที่ติดเชื้อรา *Alternaria alternata* ได้มากที่สุดเฉลี่ย 61-70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ polyoxin B เท่ากับ 54-70 เปอร์เซ็นต์ ส่วน azoxystrobin

เท่ากับ 50-65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Gopinath *et al.* (2006) ทดสอบประสิทธิภาพ difenoconazole a.i. เท่ากับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยการฉีดพ่นลงบนแปลงพริก หลังจากการปลูกเชื้อ 10 วัน สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* ได้ 61 เปอร์เซ็นต์

2. การใช้น้ำร้อน

การใช้น้ำร้อน เป็นวิธีการหนึ่งที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อและกระตุ้นความต้านทาน ระดับความปลอดภัยของความร้อนที่ใช้ควรมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่พืชจะเป็นอันตราย 2-3 องศาเซลเซียส (จิรา, 2535; Barkai-Golan and Phillips, 1991) ซึ่งผลผลิตและเชื้อแต่ละชนิดมีความไวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน (Eckert and Sommer, 1967) หากใช้ความร้อนสูง จะส่งผลต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อมากมาย เช่น กระบวนการสุกของผลไม้ การหายใจ การสังเคราะห์เอทิลีน การพัฒนาสี เป็นต้น ผลไม้บางชนิดมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชเพิ่มขึ้น โดยสัมพันธ์กับความสามารถในการรักษาความแน่นเนื้อไม่ให้ลดลง (ดนัย, 2549) ซึ่งภายหลังจากผ่านความร้อนแล้วต้องทำให้อุณหภูมิต่ำทันที เนื่องจากความร้อนที่สะสมอยู่บนผลผลิตเป็นเวลานานๆ มีผลให้สรีระของพืชเปลี่ยนแปลง เช่น สุกเร็วขึ้น (จริงแท้, 2538) การใช้ความร้อนกำจัดหรือยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อโรคนิยมใช้ในรูปแบบของความร้อนแห้ง (hot air) ความร้อนชื้น (humidified hot air) และน้ำร้อน (hot water)

ผักผลไม้สดสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 50-60 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที ฉะนั้นการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวโดยให้ความร้อนที่มากกว่า 40 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที สามารถควบคุมการเน่าเสียของผลผลิต จากเชื้อโรคที่พบบนผิวหรือเซลล์ชั้นนอก (outer cell layers) ได้ ในขณะที่ผลผลิตมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย (Barkai-Golan and Phillips, 1991)

การจุ่มกล้วยในอุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ใช้ควบคุมโรคแอนแทรคโนส (สายชล, 2528) ผลมะนาวฝรั่งจุ่มในน้ำร้อน 46-49 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที หยุดการเจริญของเชื้อรา *Phytophthora citrophthora* ได้ เมื่อเชื้อราชนิดนี้ยังไม่แทงเข้าไปสู่เนื้อเยื่อชั้นนอกของเปลือก (ดนัย, 2549) การควบคุมโรคราสีเขียวของส้มโดยการจุ่มผลส้มที่น้ำร้อนอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียสสามารถลดการเกิดโรคได้ 58.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การจุ่มที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียสพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีที่สุด แต่ผลส้มแสดงอาการ heat injury (บูรณี, 2548) การจุ่มผลส้มพันธุ์ Valencia ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที อุณหภูมิที่แกนกลางผล 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 นาที และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ชุดการทดลองที่ให้อุณหภูมิภายในผล 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 42 นาที สามารถฆ่า conidia ของเชื้อรา *Colletotrichum gleosporioides*, *Penicillium digitatum* และ *P. italicum* ได้ดีกว่าทุกชุดการทดลอง และคุณภาพของส้มก็ดีกว่าเช่นเดียวกัน (Lurie *et al.*, 1990) Spotts (1984) รายงานการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 53.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถควบคุมเชื้อรา *Penicillium* spp. และ *Phomopsis* spp.

อย่างไรก็ดีการใช้น้ำร้อนไม่มีสารตกค้างที่ให้ผลในการป้องกันการเข้าทำลายที่จะเกิดขึ้นใหม่และอาจก่อให้เกิดเสียหายจากความร้อน โดยทำให้การเปลี่ยนสีของผลผิดปกติ ลดอายุการเก็บรักษา และอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของจุลินทรีย์อื่น (Edney and Burchill, 1967) อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำอันตรายต่อเนื้อเยื่อพืช (heat injury) ในผลไม้บางชนิดอาจทำให้เกิดการสูญเสียกลิ่นทำให้ผลผลิตเหี่ยว (จิรา, 2535)

3. การใช้น้ำร้อนร่วมกับสารเคมี

เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคให้ดียิ่งขึ้น มากกว่าการใช้น้ำร้อนหรือสารเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งใช้ในการควบคุมการเน่าเสียของผลพลัม แอปเปิล มะม่วง และผลไม้ตระกูลส้ม (Houck, 1967; Well and Harvey, 1970) ศรายุทธ (2556) รายงานประสิทธิภาพการจุ่มผลแก้วมังกรลงในสารเคมี prochloraz ความเข้มข้น 200 ppm ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่าสามารถควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *D. dominicana* ได้อย่างสมบูรณ์

ในทางการค้า การส่งออกมะม่วงจากประเทศจาไมกาไปยังประเทศอังกฤษ ใช้ระยะเวลา 24 วัน ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส พบว่า มะม่วงที่จุ่มน้ำร้อน 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เกือบทุกผลแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสเล็กน้อย แต่เมื่อเติม benomyl ซึ่งเป็นสารเคมีป้องกันโรคพืช 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในน้ำร้อน พบว่า ผลมะม่วงไม่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสเมื่อถึงปลายทาง บูรณี (2548) รายงานว่า การใช้สารเคมี imazalil ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมโรคราสีเขียว ที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้อย่างสมบูรณ์ โดยการจุ่มเพียง 2 นาที Spalding (1982) พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิสารเคมีเป็น 52 องศาเซลเซียส จะให้ผลในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสที่เกิดจากเชื้อรา

Colletotrichum gleosporioides และโรค stem end rot ที่เกิดจากเชื้อรา *Phomopsis citri* ของมะม่วงพันธุ์ Tommy Atkins และ Keitt ได้ดีกว่าการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว ฉะนั้น การใช้น้ำร้อนร่วมกับสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดโรคพืชได้ดียิ่งขึ้น (Ben-Yehoshua, 1985)

สารพิษตกค้างในอาหาร

กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หรือผลิตผลที่จะนำมาบริโภคเป็นอาหารในปัจจุบัน มีการนำสารเคมีหรือวัตถุอันตรายทางการเกษตรเข้ามาใช้ วัตถุอันตรายทางการเกษตรหมายถึง สารที่มีจุดมุ่งหมายใช้เพื่อป้องกัน ทำลาย ดึงดูด ขับไล่ หรือควบคุมศัตรูพืชและสัตว์ หรือพืชและสัตว์ที่ไม่พึงประสงค์ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ระหว่างการเพาะปลูก การเก็บรักษา การขนส่ง การจำหน่าย หรือระหว่างกระบวนการผลิตสินค้า อาหาร หรืออาหารสัตว์ หรือเป็นสารที่อาจใช้กับสัตว์เพื่อควบคุมปรสิตภายนอก (ectoparasites) ซึ่งมีความหมายตรงกับคำว่า pesticide ตามความหมายที่ใช้ในการกำหนดมาตรฐาน Codex ผลของการนำสารเคมีหรือวัตถุอันตรายทางการเกษตรมาใช้ทำให้เกิดสารพิษตกค้าง (pesticide residue)ในสินค้า คณะกรรมการมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติหรือหน่วยงานที่มีอำนาจหน้าที่ตามกฎหมาย จึงได้มีการกำหนดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (Maximum Residue Limit: MRL) ที่มีได้ในสินค้า มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมสารพิษตกค้างต่อกิโลกรัมสินค้า (สำนักงานมาตรฐานสินค้าการเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2551) ดังแสดงไว้ในตาราง

ตารางแสดงปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดในสินค้าตามมาตรฐาน Codex

ชนิดสารเคมี	**ชนิดสินค้า (ผลไม้)**	**ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด (มก/กก)**
Imazalil	ผลไม้ที่มีเปลือกบางเช่น แอปเปิล	5
	กล้วย	2
	เมลอน ยกเว้นแตงโม	2
	ราสเบอร์รี, แบล็คเบอร์รี	2
	สตรอเบอร์รี	2
	ส้ม	5
Prochloraz	ผลไม้ที่กินเปลือกไม่ได้	7
	ส้ม	10
	พริก	10
Difenoconazole	ผลไม้ที่มีเปลือกบางเช่น แอปเปิล	0.5
	กล้วย	0.1
	มะม่วง	0.07
	ลูกพีช	0.5
	องุ่น	0.1
	เชอร์รี	0.2
	มะละกอ	0.2

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานสินค้าการเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2552)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาการเกิดโรคผลเน่าของแก้วมังกร

เตรียมผลแก้วมังกรที่ได้จากสวนอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร จำนวน 50 ผล มาศึกษาหาปริมาณการเกิดโรคและเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่า ยกเว้นผลจากอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ซึ่งมีจำนวนผลไม่เพียงพอ จึงทำได้เพียงศึกษาเชื้อสาเหตุ โดยนำผลแก้วมังกร แบ่งเป็น 5 ซ้ำๆ ละ 10 ผล มาเรียงใส่ตะกร้า คลุมด้วยถุงพลาสติกใสที่มีรู เก็บที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยตรวจสอบการเกิดโรค จากนั้นนำผลแก้วมังกรที่แสดงอาการโรคผลเน่ามาแยกเชื้อด้วยวิธี tissue transplanting โดยตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างส่วนที่เป็นโรคกับส่วนปกติของผลแก้วมังกร ขนาดประมาณ 5×5 มิลลิเมตร แช่ใน 1 เปอร์เซ็นต์ sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซับด้วยกระดาษซับฆ่าเชื้อ ทิ้งให้แห้ง จึงนำไปวางบนอาหาร PDA บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยของเชื้อเจริญออกมาจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชแล้ว ให้ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยย้ายเชื้อลงบน PDA และเลี้ยงจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

2. จำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าบนผลแก้วมังกร

2.1 การจำแนกเชื้อโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา

นำเนื้อเยื่อผลแก้วมังกรที่แสดงอาการโรคผลเน่าจากแหล่งปลูก 3 แหล่งคือ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร และอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย มาทำ freehand section เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อรา และขนาดของ conidia โดยนำไปตรวจและวัดขนาดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope

2.2 การจำแนกเชื้อโดยวิธีทางโมเลกุล

2.2.1 การเตรียมเชื้อรา นำเชื้อราที่ได้ทำการแยกเป็น conidia เดี่ยว แล้วเลี้ยงลงบนอาหาร PDA ภายใต้แสง near ultraviolet และ fluorescent สลับมืด 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วันแล้วมาทำ conidial suspension โดยเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงบนโคโลนีของเชื้อรา ใช้แท่งแก้วงอขูดผิวหน้า

อาหารเบาๆ จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อเอาเฉพาะส่วนของ conidia แล้วดูด conidial suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ บ่มเชื้อโดยการเขย่าบน rotary shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเส้นใยโดยนำมากรองบนกระดาษกรอง (Whatman No.1) ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อผ่านกระดาษกรองแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ

2.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ นำเส้นใยของเชื้อมาบดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม solution I ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (30 mM Tris HCl, pH 8; 0.1 M NaCl; 1 mM EDTA และ 0.2 M sucrose) และ solution II ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (400 mM Tris HCl, pH 9.2; 250 mM EDTA และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ของ SDS) ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม solution III ปริมาตร 192 ไมโครลิตร (60 ml 5 M KOAC; 11.5 ml 96 เปอร์เซ็นต์ของ acetic acid และ 28.5 ml H_2O) และ chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดเบาๆ นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำเข้าเครื่อง centrifuge ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นใช้ปิเปตดูดเฉพาะส่วนใสย้ายลงหลอดใหม่ เติม absolute alcohol อัตราส่วน 1:1 กลับหลอดไปมาเบาๆ นำเข้าเครื่อง centrifuge อีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยดูดแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ใส่ในหลอดที่มีดีเอ็นเอ กลับหลอดไปมาเบาๆ จึงเททิ้ง ผึ่งที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งหลอดแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE (10 mM Tris HCl pH 8 และ 1 mM EDTA) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตฟอรีซีส (agarose gel electrophoresis) บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 0.5XTBE buffer เป็นเวลา 25 นาที กระแสไฟ 135 โวลล์ หลังจากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGENE BIOIMAGING)

2.2.3 การทำ PCR (Polymerase Chain Reaction) เตรียม master mix ซึ่งประกอบด้วย

10xPCR buffer	5 ไมโครลิตร
$MgCl_2$	2 ไมโครลิตร
Deoxy nucleotide triphosphate (dNTP)	2.5 ไมโครลิตร
Primer ITS1 (20 µM)	0.5 ไมโครลิตร

Primer ITS4 (20 µM)	0.5 ไมโครลิตร
Sterile dH_2O	37.5 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	1 ไมโครลิตร

Primer ITS1 มีลำดับเบส 5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’

Primer ITS4 มีลำดับเบส 5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’

นำ master mix ใส่ในหลอด PCR ที่มี DNA template ปริมาตร 1 ไมโครลิตรอยู่แล้วนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycle จำนวนรอบเท่ากับ 35 รอบ โดยอุณหภูมิและเวลาที่ใช้เป็นดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	5 นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที
Annealing	56 องศาเซลเซียส	1 นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
Final extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

ตรวจสอบคุณภาพของ PCR product โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตฟอรีซีส (agarose gel electrophoresis) บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5XTBE buffer เป็นเวลา 25 นาที กระแสไฟ 135 โวลล์ นำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGENE BIO IMAGING) โดยใช้ marker 100 bp plus

2.2.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส (Sequencing analysis) วิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR โดยนำดีเอ็นเอส่งไปวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.2.5 การเปรียบเทียบลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้วิเคราะห์แล้วมาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank เพื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงในระดับสกุลและสปีชีส์กับฐานข้อมูลที่มีอยู่

3. ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* บนผลแก้วมังกร

3.1 ศึกษาระยะเวลาการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร

เตรียม conidial suspension ของเชื้อรา *B. cactivora* ความเข้มข้น 1×10^{6} conidia ต่อมิลลิลิตร ฉีดพ่นลงบนผลแก้วมังกร แล้วบ่มไว้ในถุงพลาสติกชื้นเป็นเวลา 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบระยะเวลาการบ่ม ทำการลอกส่วนของเนื้อเยื่อผิวผลแก้วมังกร วางบนสไลด์แล้วหยด lactophenol cotton blue จากนั้นจึงนำไปตรวจนับการงอกของ conidia และการสร้าง appressorium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope แล้วเลือกระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เกิดโรคได้ดีเพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

3.2 การเกาะยึดและเข้าทำลายที่ผิวผล

ปลูกเชื้อรา *B. cactivora* ลงบนผลแก้วมังกร โดยการฉีดพ่น conidial suspension ความเข้มข้น 1×10^{12} conidia ต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ในถุงพลาสติกชื้น โดยเลือกระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เริ่มเกิดโรคได้ดีจากข้อ 3.1 แล้วนำมาศึกษาการเข้าทำลายพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM) โดยตัดเนื้อเยื่อผลแก้วมังกรเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร จากนั้นล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้ใน glutaraldehyde ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ จึงนำเนื้อเยื่อไปรมด้วย osmium tetra oxide 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดึงน้ำออกจากเซลล์พืช โดยแช่ในเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ (alcohol series: 10 20 50 75 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นละ 10 นาที แล้วแช่ใน absolute alcohol 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที และดึงแอลกอฮอลล์ออกจากเซลล์พืชด้วย critical point dried ใน liquid carbon dioxide จากนั้นนำชิ้นตัวอย่างพืชวางลงบน aluminum stub แล้วนำไปเคลือบด้วยทอง (Blazer SCD 040) จึงนำตรวจด้วยกล้อง SEM ยี่ห้อ JEOL รุ่น JSM-5410LV

3.3 การเข้าทำลายในเนื้อเยื่อผล

ปลูกเชื้อรา *B. cactivora* ลงบนผลแก้วมังกร โดยใช้ mycelium plug บ่มไว้ในถุงพลาสติกชื้น โดยเลือกระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เริ่มเกิดโรคได้ดีจากข้อ 3.1 หลังจากนั้นนำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน แล้วตัดเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร ขนาดเนื้อเยื่อประมาณ 0.5×0.5 เซนติเมตร

แช่ในสารละลาย FAA (Formalin-Acetic acid-Alcohol) เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมงเพื่อหยุดการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคและคงสภาพเซลล์พืช จากนั้นนำไปแช่ใน tertiary butyl alcohol (TBA) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (alcohol series: 50 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ความเข้มข้นละ 24 ชั่วโมงเพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ แล้วย้ายลง TBA: paraffin oil อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกมาแล้วเท paraffin ที่ผ่านการหลอมเหลวแล้วใส่ในตัวอย่างพอท่วมเนื้อเยื่อพืช นำเข้าตู้อบลมร้อน (oven: Precision Thelco) อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วฝังเนื้อเยื่อพืชลงใน paraffin โดยเติม paraffin เหลวลงในแบบพิมพ์จนเต็ม จัดเรียงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชให้เป็นระเบียบ ทิ้งให้แข็งตัวอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแท่ง paraffin ที่มีเนื้อเยื่อพืชฝังอยู่ออกจากแบบพิมพ์ แล้วตัดเป็นชิ้นรูปสามเหลี่ยมคางหมู ติดลงบนแท่งไม้ ตัดแต่งให้เรียบร้อยแล้วนำไปตัดด้วยเครื่อง rotary microtome โดยตัดเนื้อเยื่อพืชให้มีความหนา 12 ไมครอน ทาสารละลาย Haupt’s solution ลงบนสไลด์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้วแล้ว จึงหยด formalin ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ นำชิ้นส่วนที่ตัดไว้แล้วมาติดลงบนสไลด์โดยวางแผ่นสไลด์บน slide warmer อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส และย้อมสีเนื้อเยื่อพืชด้วยด้วย safranin และ fast green โดยแช่สไลด์ลงใน xylene นาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน xylene : alcohol อัตราส่วน 1 : 1 นาน 5 นาที แล้วแช่ใน alcohol series อย่างละ 5 นาที (absolute 95 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์) ต่อมานำไปแช่ใน safranin นาน 15 นาที จุ่มสไลด์แบบผ่านใน ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมกรด lactic เล็กน้อย, ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์, absolute ethyl alcohol อย่างรวดเร็ว จากนั้นแช่ใน fast green 30 วินาที แช่ใน differentiate the fast green 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วแช่ใน xylene 3 ครั้งๆ ละ 15 นาที เอาสไลด์ออกจาก xylene หยด permout ลงบนขอบสไลด์ แล้วค่อยๆ วาง cover slide ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope โดยส่วนของเส้นใยเชื้อราจะติดสีแดงและส่วนของพืชจะติดสีเขียว (Neergaard, 1997)

4. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำร้อนในการควบคุมโรค

4.1 ศึกษาผลของน้ำร้อนในการยับยั้งการงอกของ conidia เชื้อรา

เตรียมหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิเท่ากับ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของ conidia เชื้อรา *B. cactivora* ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixture แล้วจุ่มใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 1 3 และ 5 นาที ตามลำดับ หลังจากการจุ่มหลอดทดลองในอุณหภูมิและเวลาที่กำหนดแล้ว ให้จุ่มหลอดลงในน้ำเย็นทันที แล้วใช้ปิเปตดูด conidial suspension ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร สำหรับชุดควบคุม จุ่มในน้ำอุณหภูมิปกติ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจนับการงอกของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope จำนวน 4 ซ้ำๆ ละ 50 conidia และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามสูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้งการงอกของ conidia (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

เมื่อ A = conidia ที่งอกหลังจากจุ่มในน้ำอุณหภูมิปกติ

B = conidia ที่งอกหลังจากจุ่มในน้ำร้อน

4.2 ศึกษาการใช้น้ำร้อนในการควบคุมโรคบนผลแก้วมังกร

4.2.1 ปลูกเชื้อราโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีเชื้อรา *B. cactivora* อายุ 5 วันที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราลงบนผลแก้วมังกร 2 จุดตรงข้ามกัน โดยให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสกับผิวแก้วมังกร บ่มในถุงพลาสติกชื้นโดยเลือกระยะเวลาการบ่มที่เริ่มเกิดโรคได้ดีจากข้อ 3.1 จากนั้นจุ่มผลแก้วมังกรลงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาจุ่มน้ำเย็นทันที สำหรับชุดควบคุมจุ่มในน้ำอุณหภูมิปกติ ผึ่งผลให้แห้ง คลุมด้วยถุงมีรูและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง จากสูตรข้อ 4.1 ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล

4.2.2 ปลูกเชื้อราโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีเชื้อรา *B. cactivora* อายุ 5 วันที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราลงบนผลแก้วมังกร 2 จุดตรงข้ามกัน โดยให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสกับผิวแก้วมังกร บ่มในถุงพลาสติกชื้นโดยเลือกระยะเวลาการบ่มที่เริ่มเกิดโรคได้ดีจากข้อ 3.1 จากนั้นจุ่มผลแก้วมังกรลงในน้ำร้อน โดยเลือกอุณหภูมิที่สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุดจากข้อ 4.2.1 เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาจุ่มน้ำเย็นทันที สำหรับชุดควบคุมจุ่มในน้ำอุณหภูมิปกติ ผึ่งผลให้แห้ง คลุมด้วยถุงมีรูและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยตรวจสอบการเกิดโรค และความรุนแรงของโรคโดยการวัดขนาดของแผล (เซนติเมตร) ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล

5. ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีและการใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรค

5.1 ศึกษาผลของสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

เตรียมสารเคมี imazalil prochloraz ความเข้มข้น 0 250 500 750 ppm และ difenoconazole ความเข้มข้น 0 37.5 75 150 225 ppm ในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใส่ขวดฝาเกลียวขวดละ 18 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วย autoclave เมื่ออาหารอุ่นใช้ปิเปตดูดสารเคมีจำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมกับอาหาร PDA ในขวดฝาเกลียว ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ vortex mixture แล้วเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เมื่ออาหารแข็งใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีเชื้อรา *B. cactivora* อายุ 5 วัน ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารเคมี ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวางชิ้นวุ้นตรงจุดกึ่งกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อและคว่ำด้านที่มีเส้นใยของเชื้อราลง จากนั้นนำไปภายใต้ near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อราบนอาหารเปรียบเทียบกับเชื้อราที่เจริญบนอาหารที่ไม่ผสมสารเคมี (ชุดควบคุม) และหยุดตรวจผลเมื่อเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลอง 5 ซ้ำ

5.2 ศึกษาผลของสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อการเกิดโรคผลเน่า

ปลูกเชื้อรา *B. cactivora* ลงบนผลแก้วมังกรโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลนไฟฆ่าเชื้อแล้วตัดเส้นใยบริเวณรอบนอกของโคโลนีเชื้อรา *B. cactivora* อายุ 5 วัน ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อราลงบนผลแก้วมังกร 2 จุดตรงข้ามกัน โดยให้ด้านที่มีเส้นใยสัมผัสกับผิวแก้วมังกร บ่มในถุงพลาสติกชื้นโดยเลือกระยะเวลาการบ่ม ที่เริ่มเกิดโรคได้ดีจากข้อ 3.1 จากนั้นจุ่มลงในสารเคมีจากข้อ 5.1 และระดับความเข้มข้นที่สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด เป็นเวลา 3 นาที ผึ่งผลให้แห้ง คลุมด้วยถุงมีรูและบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยตรวจสอบการเกิดโรค ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล

5.3 ศึกษาการใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรค

นำผลแก้วมังกรที่ปลูกเชื้อรา *B. cactivora* โดยวิธี mycelium plug แล้วจุ่มในสารเคมีและน้ำร้อนที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคดีที่สุด โดยเลือกสารเคมีจากข้อ 5.1 และอุณหภูมิของน้ำร้อนจากข้อ 4.2.1 เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นผึ่งผลให้แห้ง คลุมด้วยถุงมีรูและบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยตรวจสอบอัตราการเกิดโรค ทำการทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 5 ผล

6. การตรวจสารพิษตกค้างของสารเคมีบนผลแก้วมังกร

นำผลแก้วมังกรที่ผ่านการจุ่มสารเคมีแล้ว ไปตรวจสารพิษตกค้างที่ห้องปฏิบัติการกลาง ด้วยวิธี In-house method based on QuEChERS method by LC-MS/MS ตามวิธีการของ Barganska *et al.* (2014) โดยนำตัวอย่างพืชที่ต้องการทดสอบ มาสกัดด้วยวิธีการของ QuEChERS และนำไปวิเคราะห์สารพิษตกค้างด้วยเครื่อง liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

7. สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ
2. สวนแก้วมังกรของคุณปรียา-คุณพเยา ภัยนิราศ เกษตรกรอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
3. สวนแก้วมังกรเกษตรกร อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร
4. สวนแก้วมังกรเกษตรกร อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย

8. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มตั้งแต่ เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2555 ถึง เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557

ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาการเกิดโรคผลเน่าของแก้วมังกร

ผลการสำรวจการเกิดโรคผลเน่าของแก้วมังกรจากแหล่งปลูกในอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร พบการเกิดโรคผลเน่าจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* เท่ากับ 4.0 เปอร์เซ็นต์ และ 14.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งสภาพแวดล้อมของแหล่งปลูก เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมการเกิดโรค โดยอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร มีร่องน้ำระหว่างแถวปลูกแก้วมังกรทำให้มีความชื้นสะสมภายในแปลง ง่ายต่อการเกิดโรคและแพร่ระบาดของเชื้อราสาเหตุโรค จึงพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงกว่าแหล่งปลูกอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ส่วนแหล่งปลูกอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ไม่ได้สำรวจความเสียหาย เนื่องจากมีปริมาณผลไม่เพียงพอ แต่ศึกษาอาการของผลที่เป็นโรคจากเชื้อรา *B. cactovora* นอกจากยังพบการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดอื่นๆ คือ *Colletotrichum* spp. และ *Dothiorella dominicana* ซึ่งสอดคล้องกับ ศรายุทธ (2556) รายงานการสำรวจการเกิดโรคของแก้วมังกรจากแหล่งปลูก 3 แหล่งคือ อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร และอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคผลเน่า 4 ชนิดคือ *D. dominicana C. capsici C. gleosporioides* และ *B. cactivora* โดยการเกิดโรคเท่ากับ 70.3 55.0 58.3 และ 8.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การสำรวจโรคของพรพิมล และคณะ (2550) ในพื้นที่ปลูกแก้วมังกรในจังหวัดเชียงราย พะเยา ระยอง ราชบุรี และสมุทรสาคร ช่วงเดือนตุลาคม 2549-กันยายน 2550 พบว่า เชื้อรา *B. cactivora* เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคผลเน่าบนแก้วมังกร โดยพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคเท่ากับ 30.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับในต่างประเทศ พบรายงานการระบาดของเชื้อรา *B. cactivora* ในพืชตระกูล Cactaceae แถบทวีปยุโรป (Ellis, 1971)

ตารางที่ 1 การเกิดโรคผลเน่า (%) ที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* จากแหล่งปลูกแก้วมังกร 2 แหล่ง

แหล่งปลูก	การเกิดโรค (%)
อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	4.0
อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร	14.7

2. การจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าบนผลแก้วมังกร

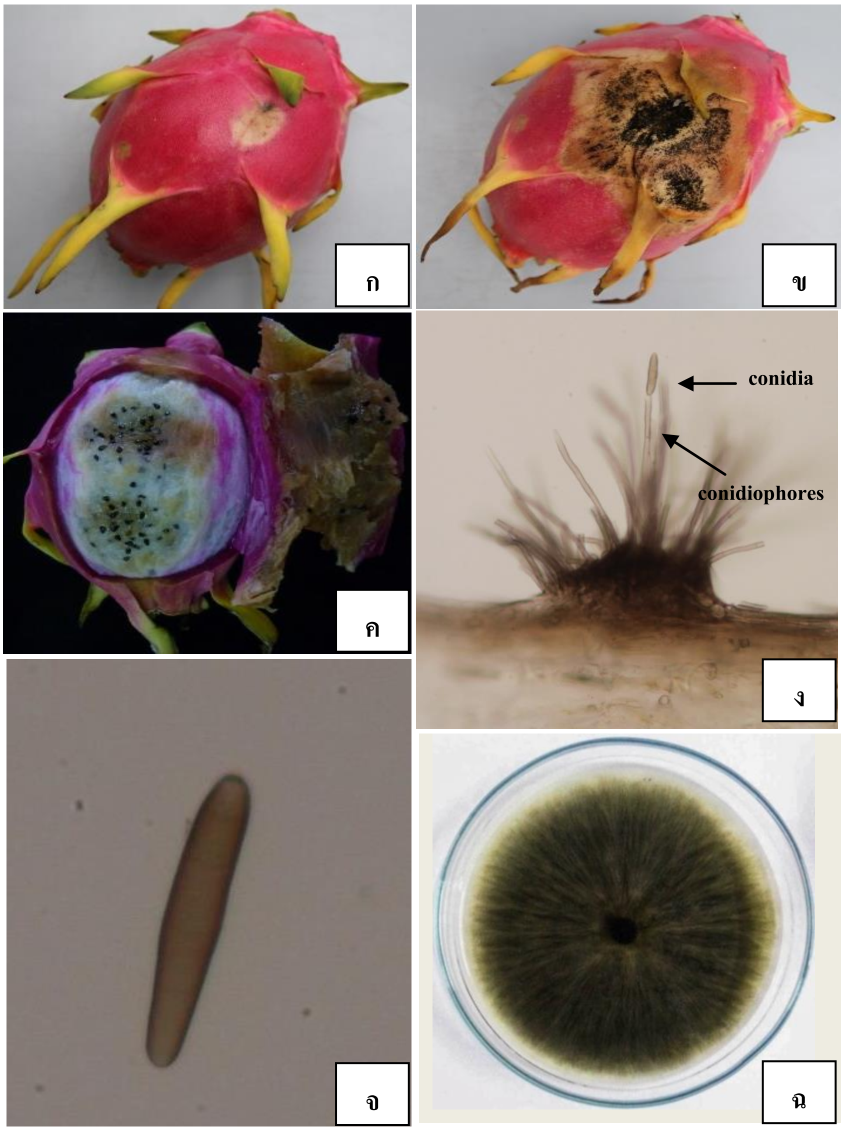
2.1 การจำแนกเชื้อโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ที่เป็นสาเหตุหนึ่งของโรคผลเน่าบนผลแก้วมังกร จากแหล่งปลูก 3 แหล่งคือ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร และอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย พบว่า เชื้อราทั้ง 3 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกัน โดยลักษณะอาการที่แสดงออกบนผลในระยะแรกเกิดแผลจุดฉ่ำน้ำ เนื้อเยื่อยุบตัวลงเล็กน้อย และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลฟางข้าว ซึ่งสามารถเห็นอาการระยะนี้ภายหลังจากการปลูกเชื้อราเพียง 1 วัน (ภาพที่ 1ก) หลังจากนั้น 2 วัน เชื้อราสร้างโครงสร้างที่ใช้ในการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศคือ conidiophores ซึ่งทำหน้าที่เป็นก้านชู conidia ที่ถูกสร้างขึ้นบนส่วนปลายของ conidiophores ลักษณะเป็นกลุ่มสีดำ ขึ้นปกคลุมบริเวณแผลที่มีการเข้าทำลาย แผลขยายใหญ่ขึ้นและลามไปยังเนื้อเยื่อผลบริเวณข้างเคียงอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 1, 2, 3ข) เมื่อตรวจสอบการเข้าทำลายเนื้อเยื่อภายใต้เปลือกผลแก้วมังกร โดยใช้มีดสแตนเลสลอกส่วนเนื้อเยื่อผิวด้านนอกสุดออก พบว่า เชื้อรา สามารถเข้าทำลายลึกถึงเนื้อเยื่อภายใต้เปลือก โดยบริเวณเนื้อเยื่อที่เชื้อเข้าทำลายมีลักษณะเน่าเละ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 1ค)

การทำ freehand section ทั้ง 3 ไอโซเลต แล้วตรวจดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope พบว่า ไอโซเลตอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา conidiophores เกิดขึ้นรวมกันเป็นกลุ่ม สีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตั้งตรงหรืออาจโค้งงอเล็กน้อย และมีผนังกั้นอย่างชัดเจน conidia มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างคล้ายกระสวยโค้งงอเล็กน้อย ภายในมีผนังกั้น 2-4 septate ลักษณะหัวท้ายมน ขนาด 21.6-44.5 x 4.3-11.8 ไมครอน (เฉลี่ย 28.9 x 6.8 ไมครอน) (ภาพที่ 1ง, จ) เช่นเดียวกับทั้ง 2 ไอโซเลต แต่มีขนาดของ conidia แตกต่างกันเล็กน้อย คือ ไอโซเลตอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร มีขนาด 20.8-45.4 x 5.1-11.9 ไมครอน (เฉลี่ย 31.6 x 7.9 ไมครอน) (ภาพที่ 2ข, ค) และอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย มีขนาด 51.8-98.7 x 11.6-22.6 ไมครอน (เฉลี่ย 75.7 x 16.0 ไมครอน) (ภาพที่ 3ข, ค) นอกจากนี้พบว่า conidia ของเชื้อราสามารถงอก germ tube ได้ทั้ง 2 ด้าน (bipolar germination)

เมื่อนำส่วนเนื้อเยื่อของผลแก้วมังกรที่แสดงอาการของโรคมาแยกเชื้อ โดยวิธี tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar พบว่า เชื้อราสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยระยะแรกจะสร้างเส้นใยสีขาว หลังจากนั้นจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเขียวขี้ม้าเข้ม จนกระทั่งเจริญเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อภายในระยะเวลา 5 วัน (ภาพที่ 1ฉ, 2ง, 3ง) ซึ่งจากลักษณะทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าคือ เชื้อรา *Bipolaris cactovora* ซึ่งสอดคล้องกับ Ellis (1971) และ Alcorn (1983) รายงานว่า เชื้อรานี้มีลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA อายุ 5 วัน สีเขียวมะกอกถึงสีเทาดำ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 9 เซนติเมตร เส้นใยเจริญอยู่บนอาหาร ด้านใต้วุ้นอาหารมีสีดำ conidiophore สีอ่อนถึงสีน้ำตาลอ่อน ตั้งตรงหรือโค้งเล็กน้อย อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ที่ส่วนฐานและที่ปลายมักโป่ง ขนาดเฉลี่ย 65.5-220 x 3.5-9.5 ไมครอน และมักพบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบนแผลที่ผลแก้วมังกร conidia รูปร่างรีตรงกลางกว้าง รูปร่างคล้ายกระสวย หรือคล้ายกระบอง มี 2-4 pseudosepta สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลทอง ขนาด 20-54 x 6-11 (ค่าเฉลี่ย 34.75 x 7.28) ไมครอน และพบว่าการงอกเกิดจากเซลล์หัวท้าย (bipolar germination)

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *B. cactivora* ทั้ง 3 ไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกัน จึงคัดเลือกเพียง 1 ไอโซเลต คือ ไอโซเลตอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย เพื่อศึกษาการจำแนกเชื้อด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล



ภาพที่ 1 โรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ไอโซเลตอำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ก. ผลแก้วมังกรที่เริ่มแสดงอาการของโรคในระยะแรก

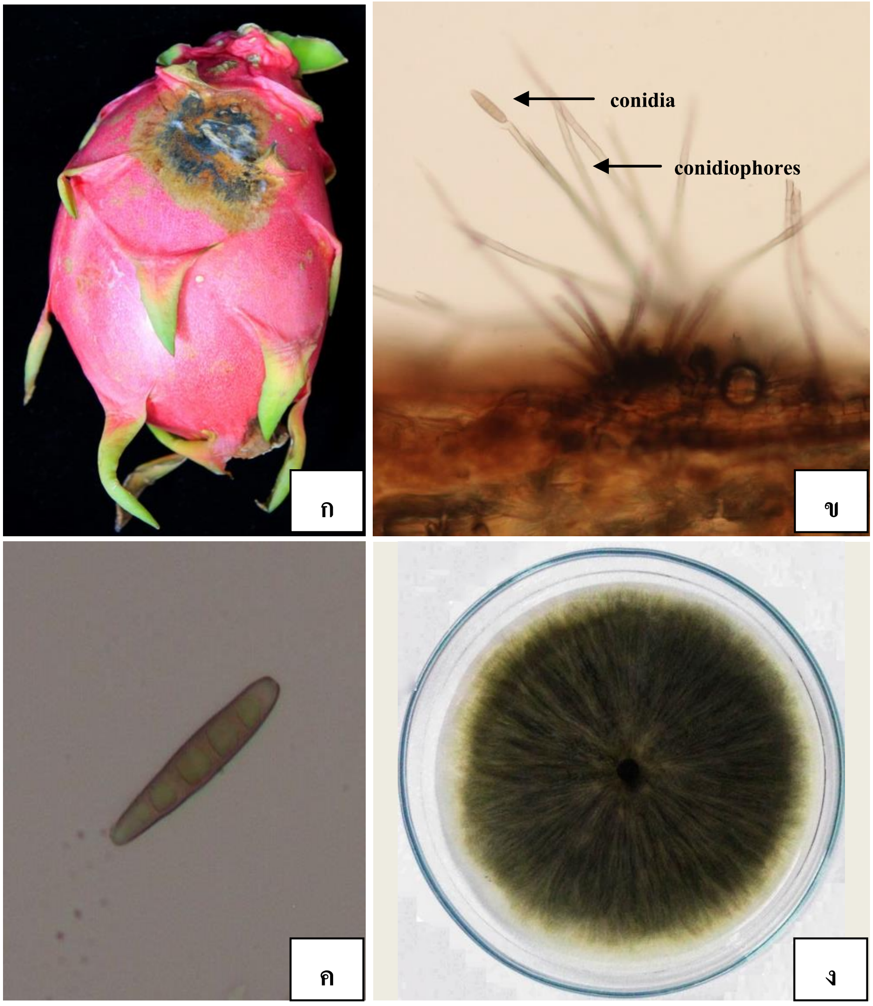
ข. Conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร

ค. เนื้อเยื่อภายใต้เปลือกผลแก้วมังกรที่แสดงอาการของโรค

ง. เชื้อรา *B. cactivora* บนเซลล์ผลแก้วมังกรโดยวิธี freehand section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 200X

จ. Conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* กำลังขยาย 200X

ฉ. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *B. cactivora* บนอาหาร PDA อายุ 5 วัน



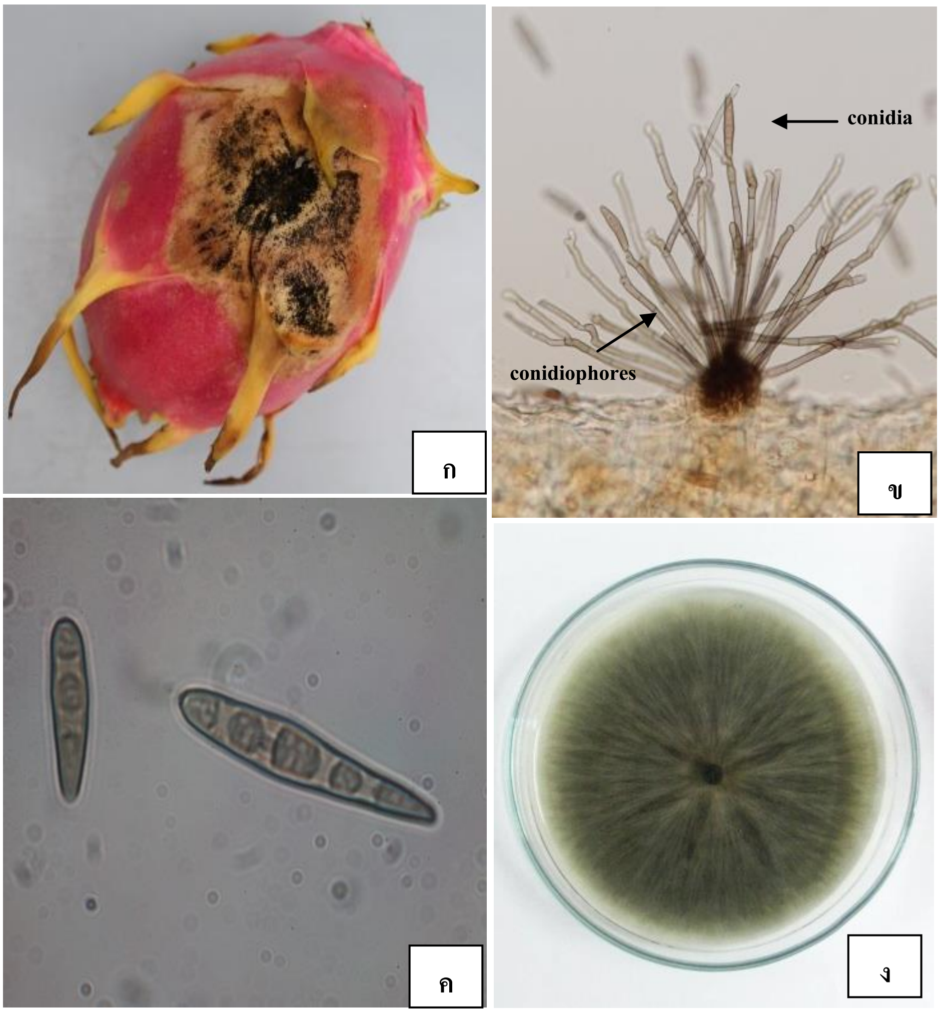
ภาพที่ 2 โรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ไอโซเลตอำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร

ก. ลักษณะอาการของโรคและกลุ่มของ conidia เชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร

ข. เชื้อรา *B. cactivora* บนเซลล์ผลแก้วมังกรโดยวิธี freehand section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 200X

ค. Conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* กำลังขยาย 200X

ง. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *B. cactivora* บนอาหาร PDA อายุ 5 วัน



ภาพที่ 3 โรคผลเน่าบนผลแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *Bipolaris cactivora* ไอโซเลตอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย

ก. ลักษณะอาการของโรคและกลุ่มของ conidia เชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร

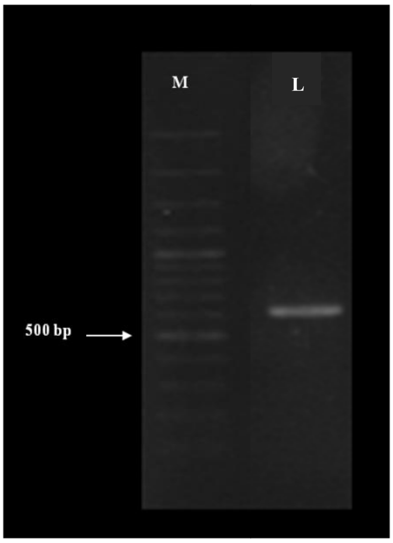
ข. เชื้อรา *B. cactivora* บนเซลล์ผลแก้วมังกรโดยวิธี freehand section ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 200X

ค. Conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* กำลังขยาย 200X

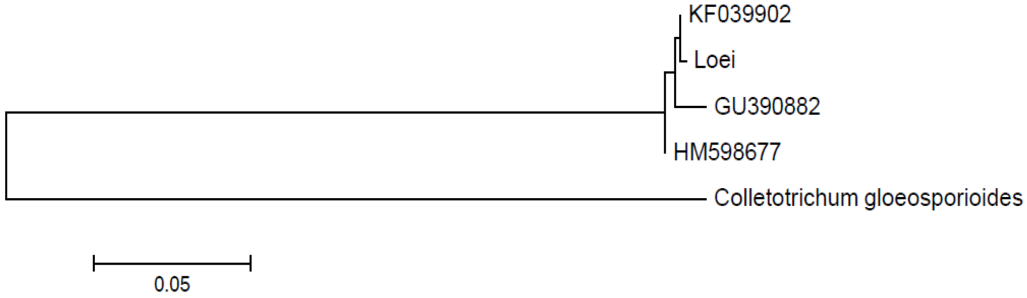
ง. ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *B. cactivora* บนอาหาร PDA อายุ 5 วัน

2.2 การจำแนกเชื้อโดยวิธีทางโมเลกุล

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร ด้วยวิธีการ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 ขนาดของ PCR product ประมาณ 600 คู่เบส (bp) (ภาพที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่า ไอโซเลตจากแหล่งปลูก อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับเชื้อรา *B. cactivora* accession no. KF 039902 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร จากประเทศเวียดนาม และ *B. cactivora* accession no. GU 390882 99 เปอร์เซ็นต์ ที่มีรายงานว่า เป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกรในประเทศจีน (ภาพที่ 5) สอดคล้องกับรายงานของ Tarnowski *et al.* (2010) ที่พบเชื้อรา *B. cactivora* ซึ่งแยกได้จากผลแก้วมังกรที่แสดงอาการผลเน่า ในทางตอนใต้ของฟลอริดา และไอโซเลตดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับเชื้อรา *B. cactivora* accession no. GU 390882 99.7 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 แสดงขนาดของ PCR product เชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าบนแก้วมังกร โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และใช้ marker 100 bp plus



ภาพที่ 5 แสดง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อรา *B. cactivora* สาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร โดยใช้โปรแกรม Mega5 version 0.3

3. ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *Bipolaris cactivora* บนผลแก้วมังกร

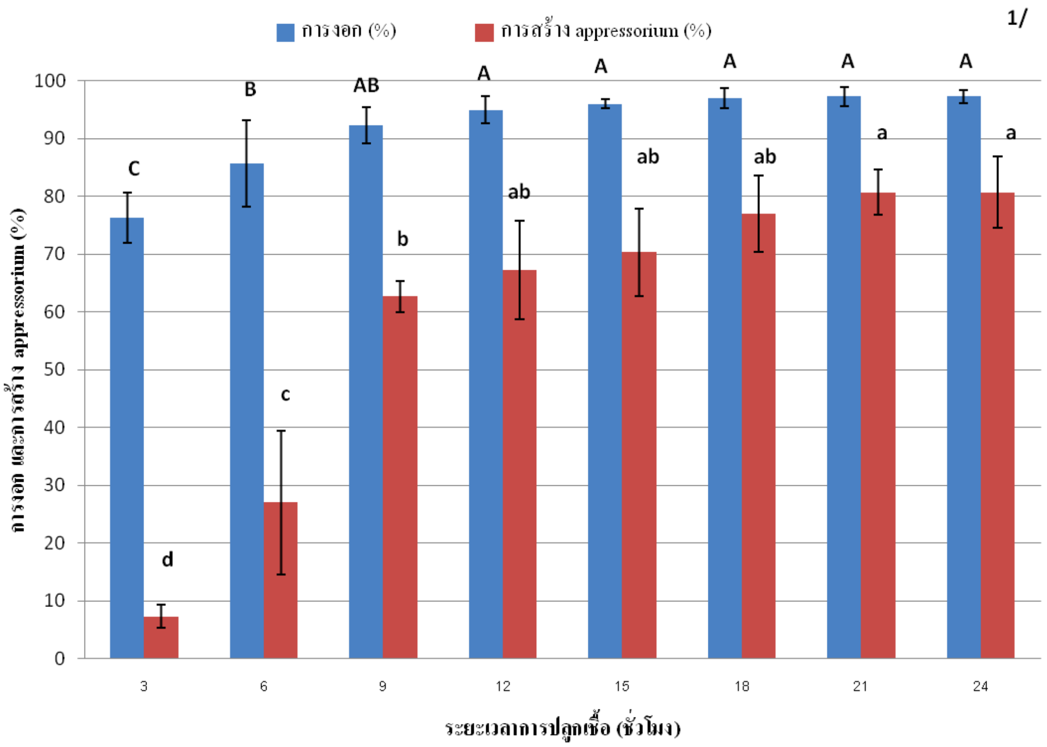
3.1 ศึกษาระยะเวลาการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร

การงอกของ conidia และการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร พบว่า conidia เริ่มงอกภายหลังการปลูกเชื้อและบ่มในสภาพชื้นเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เฉลี่ยเท่ากับ 76.3 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อระยะเวลา 9 ชั่วโมง conidia งอกได้เท่ากับ 85.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะเวลา 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง สำหรับการสร้าง appressoria พบว่าเชื้อรา *B. cactivora* เริ่มสร้าง appressoria ตั้งแต่ระยะเวลา 3 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ เท่ากับ 7.3 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการสร้างเพิ่มสูงขึ้น ตามระยะเวลาการบ่มในสภาพชื้น โดยที่ระยะเวลา 9 ชั่วโมง สร้าง appressoria ได้เท่ากับ 62.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับระยะเวลา 12 15 18 ชั่วโมง และสูงสุดเท่ากับ 80.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 21 และ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 6)

ระยะเวลาการเข้าทำลายของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร เริ่มจาก conidia งอก germ tube ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเชื้อ ควบคู่ไปกับการสร้าง appressoria โดยการงอก germ tube และการสร้าง appressoria มีปริมาณสูงสุดที่ระยะเวลา 21 ชั่วโมง เท่ากับ 97.3 และ 80.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า กระบวนการติดเชื้อมีโอกาสเกิดขึ้นตั้งแต่ 3 ชั่วโมงหลังจาก ที่เชื้อได้สัมผัสและยึดเกาะบนผลแก้วมังกร และพบว่าปัจจัยที่สำคัญในการงอกของ conidia คือ ความชื้น โดยการบ่มในสภาพชื้นเป็นระยะเวลานาน ทำให้ conidia เกิดการงอกและสร้าง appressoria มากขึ้นตามลำดับ

ชิดชนกและสมศิริ (2556) ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนผลแก้วมังกร พบว่า conidia เริ่มสร้าง appressoria ภายหลังการปลูกเชื้อ 3 ชั่วโมง เท่ากับ 11.9 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงที่สุดในระยะเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 89.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการงอก germ tube พบมีค่าการงอกสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 55.8 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่า *Colletotrichum* spp. สามารถเข้าทำลายผลแก้วมังกรตั้งแต่ระยะตุ่มดอกจนถึงระยะก่อนการเก็บเกี่ยว โดยเข้าทำลายผลในช่วงระยะก่อนการเก็บเกี่ยว อายุ 8 สัปดาห์ สูงสุด 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลอายุ 7 สัปดาห์พบการเข้าทำลาย 1.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเข้าทำลายใบองุ่น ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสในองุ่นพันธุ์ Loose Perlette พบว่า conidia สามารถงอก germ tube ได้ภายหลังการปลูกเชื้อ 1 ชั่วโมง และสร้าง appressoria ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 ชั่วโมง และบนองุ่นพันธุ์ Marroo Seedless conidia สามารถงอก germ tube และสร้าง appressoria ได้ภายหลังการปลูกเชื้อ 1 ชั่วโมง โดยจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อได้รับความชื้นเป็นระยะเวลานานขึ้น (รัตติรส, 2553) นอกจากนี้ Martinez *et al.* (2004) พบว่า เชื้อรา *Helminthosporium solani* สาเหตุโรค silver scurf ในหัวมันฝรั่ง จะเริ่มงอก germ tube ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 6 ชั่วโมง ในขณะที่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เกิดขึ้นภายในเวลา 12 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากสารอาหารต่างๆ บนเนื้อเยื่อพืชหลากหลายและสมบูรณ์มากกว่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กระบวนการงอกบนเนื้อเยื่อพืชจึงเกิดขึ้นได้เร็วกว่า

ความชื้น เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเจริญและพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคพืช โดยเชื้อราส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจน และอาศัยอินทรียวัตถุในที่ที่มีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม นอกจากนี้ความชื้นที่เหมาะสม ยังส่งเสริมให้เชื้อราสร้างสารพิษในระหว่างการเจริญและสร้างเส้นใย การสร้างสารพิษอาจเพื่อปรับสภาพให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การทำให้พืชอาศัยอ่อนแอง่ายต่อการเข้าทำลาย หรือจำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือการพัฒนาของเชื้อราเอง (Hussein and Brasel, 2001) ซึ่งเชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษในผลไม้ ได้แก่ *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. เป็นต้น ฉะนั้นการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างการเก็บรักษา ควรมีการจัดการสุขาภิบาลที่ดี เก็บในสภาพที่เหมาะสมเพื่อป้องกันการเกิดความชื้นภายในบรรจุภัณฑ์ (Jackson and Al-Taher, 2008)



ภาพที่ 6 ระยะเวลาการงอกและการสร้าง appressoria ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกรที่ได้รับการปลูกเชื้อ และบ่มในสภาพชื้น เป็นระยะเวลา 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

[1/] ค่าเฉลี่ยในแผนภูมิแท่งสีแดงที่มีตัวอักษรพิมพ์เล็กเหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และค่าเฉลี่ยในแผนภูมิแท่งสีน้ำเงินที่มีตัวอักษรพิมพ์ใหญ่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan's New Multiple Range Test

จากผลการทดลองข้างต้น จึงคัดเลือกระยะเวลาการบ่มเชื้อที่เกิดโรคได้ดีเพื่อนำไปใช้ในการทดลองถัดไปคือ 18 ชั่วโมง เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การงอกของ conidia และการสร้าง appressorium อยู่ในระดับที่สูง เท่ากับ 97 และ 77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับระยะเวลาการบ่มที่ 24 ชั่วโมง

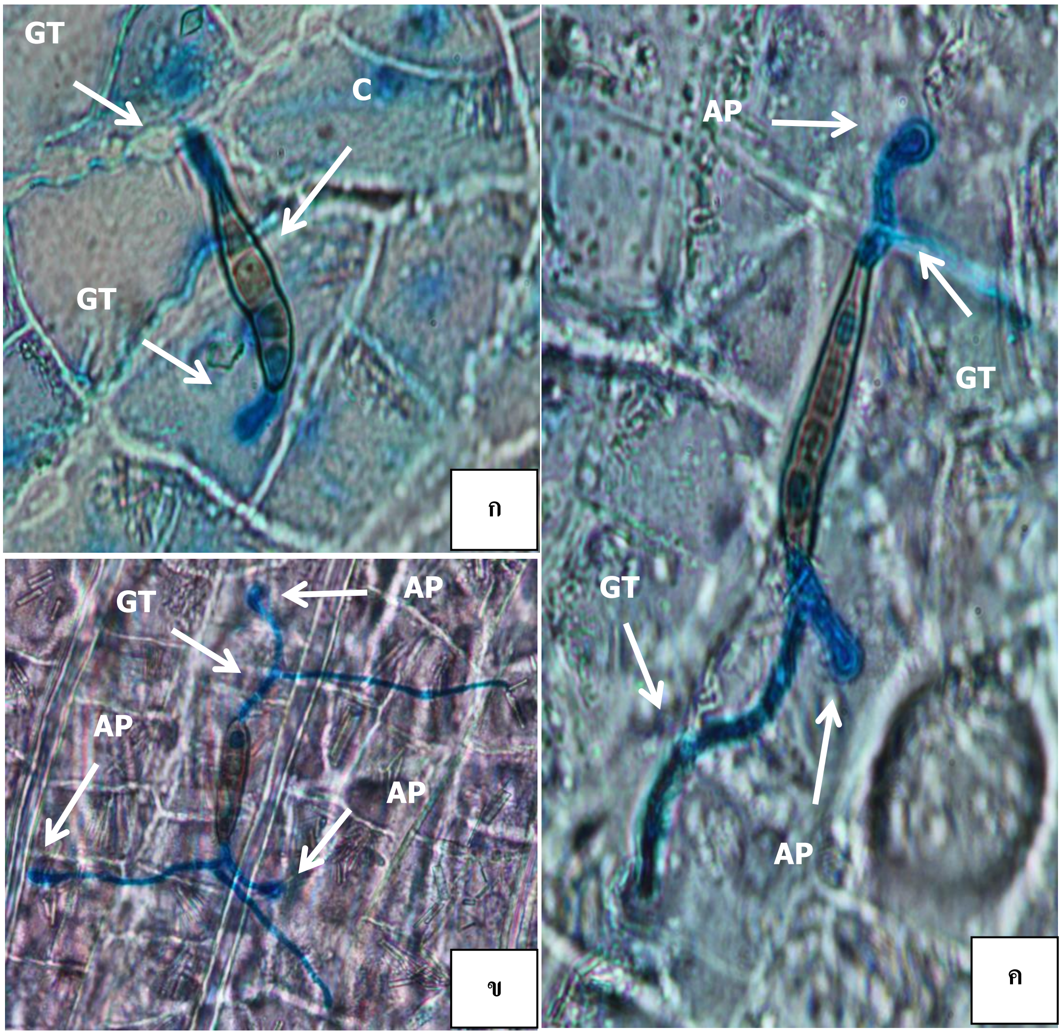
3.2 การเกาะยึดและเข้าทำลายที่ผิวผล

การเข้าทำลายของเชื้อรา *B. cactivora* เริ่มแรก conidia จะยึดเกาะบริเวณผิวพืช แล้วงอกโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายท่อเรียกว่า germ tube โดยเชื้อรา *B. cactivora* มีลักษณะที่งอก germ tube ได้ทั้งด้านหัวและด้านท้ายของ conidia หรือเรียกว่า bipolar germination จากนั้นจึงสร้าง appressoria บริเวณส่วนปลายของ germ tube มีลักษณะค่อนข้างกลม (lobe) ผนังหนา บาง conidia พบได้มากกว่า 1 appressorium (ภาพที่ 7, 8) เชื้อราบางชนิด ได้แก่ *B. maydis* สาเหตุโรคใบไหม้แผลเล็กในข้าวโพด (Evans *et al.*, 1981; Evans and Stempen, 1986) *H. victoriae* สาเหตุโรค Victoria blight ในข้าวโอ๊ต (Wheeler and Gantz, 1979) และ *B. sorokiniana* สาเหตุโรค spot blotch และ root rot ในข้าวบาร์เลย์ (Carlson *et al.*, 1991) มีโครงสร้างที่เรียกว่า extracellular sheath ที่เชื้อราสามารถสร้างบนเนื้อเยื่อพืช ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกาะยึดผิวพืชระหว่างเชื้อรากับเนื้อเยื่อพืช (Nicole *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตามโครงสร้างดังกล่าวไม่พบในเชื้อรา *H. solani* สาเหตุโรค silver scurf ในมันฝรั่ง (Martinez *et al.*, 2004) จากลักษณะการงอกของ germ tube ของเชื้อราสอดคล้องกับ Heiny and McIntyre (1983) รายงานว่า conidia ของเชื้อรา *H. solani* สามารถงอก germ tube ได้ 2 แบบคือ unipolar และ bipolar

ภายใน appressoria ของเชื้อรามีสารที่เรียกว่า เมลานิน (melanin) สะสมอยู่บริเวณผิว ทำให้มีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ โดยสารเมลานินมีบทบาทในการป้องกันอันตรายจากรังสีต่างๆ ช่วยเสริมสร้างให้ผนังของ appressoria มีความแข็งแรง (Prusky and Plumbley, 1992) ส่งเสริมให้เกิดแรงดันของของเหลวภายในซึ่งมีความจำเป็นในการแทงผ่านชั้น cuticle ของพืช และสร้าง penetration hypha (Kuba *et al.*, 1987) ที่เป็นโครงสร้างในการใช้แทงผ่านชั้น epidermal cell ของพืช สารเมลานินยังพบได้ใน conidia และเส้นใยของเชื้อรา *Helminthosporium* spp. เช่น *H. solani* ซึ่งส่งผลให้โครงสร้างเหล่านี้มีสีดำ สารเมลานินมีความสำคัญในกระบวนการอยู่รอดและการดำรงอยู่ของเชื้อรา อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าทำลายของเชื้อรา (Takano *et al.*, 1997) นอกจากบทบาทในการส่งเสริมการเกิดโรคพืชแล้ว สารเมลานินยังเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเชื้อราโรคพืชกับเชื้อราปฏิปักษ์ (Butler and Day, 1998; El Bassam *et al.*, 2002)

โดยทั่วไปแล้ว conidia ของเชื้อราสาเหตุโรคพืช ถูกห่อหุ้มด้วยเมือกที่มีความชื้น (spore matrix) ประด้วยสาร polysaccharides และ glycoprotein ซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ จึงสามารถผลิตสารหรือเอนไซม์บางชนิดเพื่อง่ายต่อการเข้าทำลาย และใช้ในการย่อย

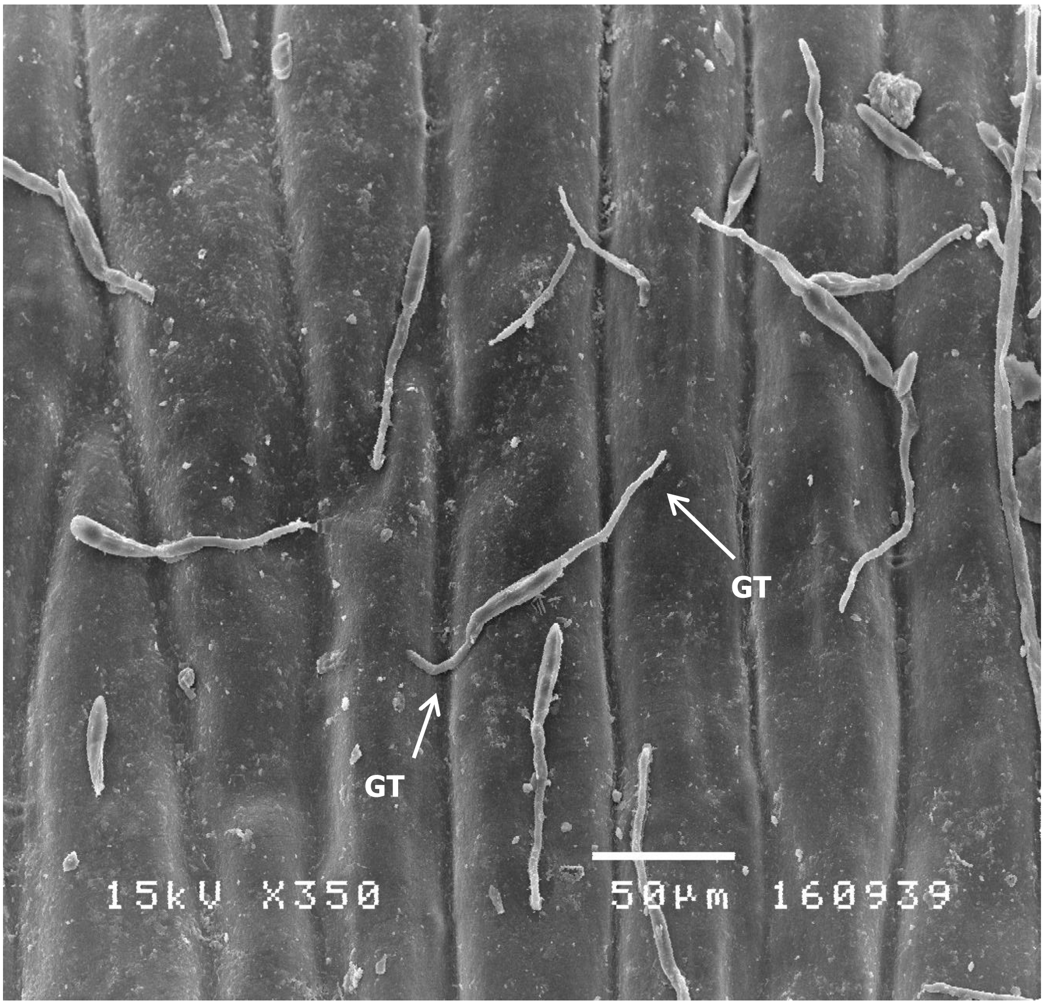
สลายพวกน้ำตาลเชิงซ้อน (complex polysaccharides) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของพืช (Bateman and Millar, 1966; Wood, 1967; Albersheim *et al.*, 1969; Wood, 1973) และที่เป็นส่วนประกอบของเมมเบรนพืช (Porter, 1966; Tseng and Bateman, 1968) เอนไซม์เหล่านี้เป็นสารที่มีความเสถียรสูง ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างขึ้น และพบได้ในเนื้อเยื่อพืชที่ติดเชื้อ ซึ่งส่งผลให้ผนังเซลล์ถูกบุกรุก (penetrate) โดยเชื้อสาเหตุโรค และในที่สุดเชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าครอบครอง (colonize) เนื้อเยื่อของพืชได้ (Bateman and Basham, 1976) เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ pectinase เช่น polygalacturonase pectin lyase pectate lyase และ pectin esterase ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์อันดับแรกที่เชื้อราสาเหตุโรคผลิต และมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรค (pathogenesis) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ polygalacturonase ทำหน้าที่ยับยั้งกิจกรรมทั้งภายในและภายนอก (endo and exo activities) เซลล์ของพืช พบมากในเชื้อรา *Botrytis* sp. และ *Sclerotinia* sp. ซึ่งเชื้อราที่มีเอนไซม์ชนิดนี้ สามารถเข้าทำลายพืชได้หลายชนิดมากกว่าเชื้อราที่มีเพียงเอนไซม์ endopolygalacturonase เช่น *Colletotrichum lindemuthianum* (Marie-Thérèse *et al.*, 2000)



ภาพที่ 7 Conidia (C) ของเชื้อรา *B. cactivora* บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 400X

ก. ลักษณะการงอก germ tube (GT) ทั้งด้านหัวและด้านท้าย (bipolar germination)

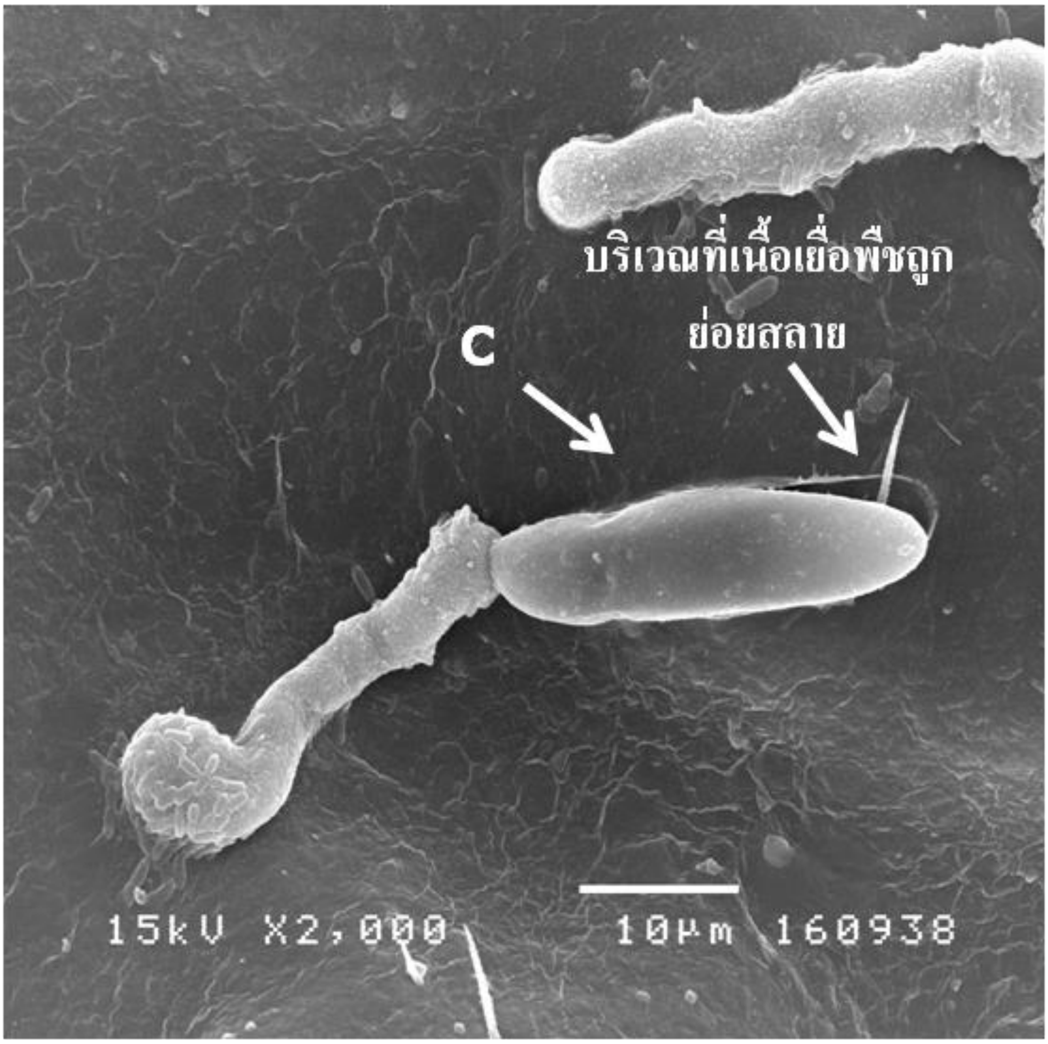
ข-ค. ลักษณะการงอก germ tube (GT) ทั้งด้านหัวและด้านท้าย (bipolar germination) และสร้าง appressoria (AP) มากกว่า 1 appressorium


GT
GT
15kV X350
50µm 160939

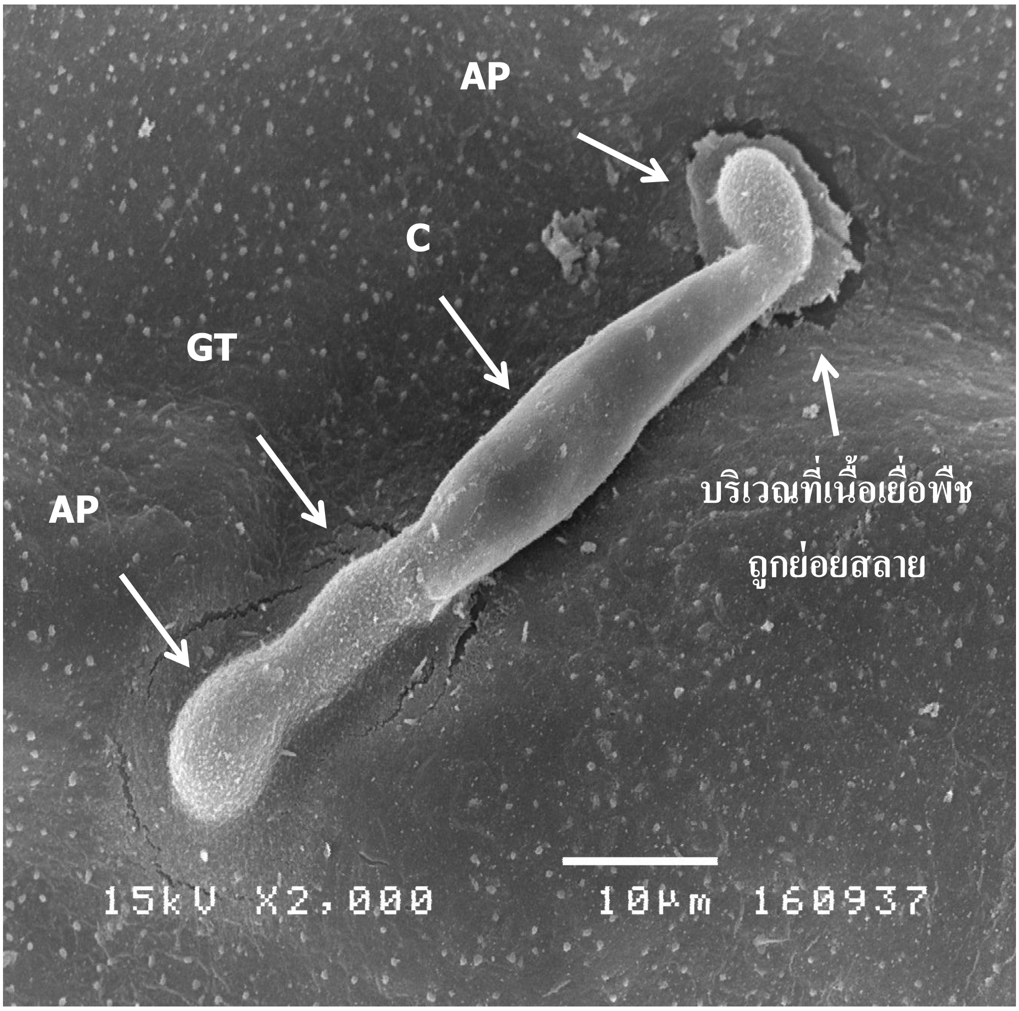
ภาพที่ 8 ลักษณะของ germ tube (GT) ที่งอกจาก conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* โดยงอกทั้งเซลล์ด้านหัวและด้านท้าย (bipolar germination) หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM)

บริเวณเนื้อเยื่อพืชโดยรอบที่สัมผัสกับ conidia ของเชื้อรา *B. cactivora* เกิดการยุบตัวเล็กน้อย และถูกย่อยสลาย (ภาพที่ 9, 10) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการผลิตสารหรือเอนไซม์บางชนิดเพื่อมาย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชให้ง่ายต่อการเข้าทำลาย Vidhyasekaran *et al.* (1992) รายงานว่า เชื้อรา *H. oryzae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของข้าว สามารถผลิต host-specific toxin ที่มีบทบาทสำคัญในการบุกรุก (invade) และครอบครอง (colonize) เนื้อเยื่อพืช ซึ่งบริเวณเซลล์พืชประกอบด้วยสารประกอบต่างๆ เช่น phenolic peroxidase และ polyphenol oxidase ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการทำลายของเชื้อสาเหตุโรค เช่นเดียวกับ host-specific toxin ที่ทำหน้าที่สลายสารประกอบเหล่านี้เพื่อให้เชื้อสามารถครอบครอง (colonize) เซลล์พืชได้

นอกจากบทบาทในการย่อยสลายสารประกอบต่างๆ บริเวณเนื้อเยื่อพืชแล้ว HC toxin ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *H. carbonum* (*B. zeicola* Stout (Shoemaker)) สาเหตุโรค Helminthosporium leaf spot ของข้าวโพด ส่งผลต่ออัตราการหายใจของข้าวโพดทั้งพันธุ์อ่อนแอและพันธุ์ต้านทานเพิ่มขึ้น เซลล์พืชมีความสามารถในการตรึง CO_2 ในที่มืด และทำให้เกิดการนำเข้า (uptake) สารต่างๆ เข้าสู่เนื้อเยื่อพืช เช่น NO_3^- NA^+ Cl^- 3-*O*-methylglucose และ leucine ทั้งนี้ประสิทธิภาพของ HC toxin เป็นผลมาจากอุณหภูมิ ความเข้มข้น ระยะเวลาการสัมผัสของ HC toxin กับพืช และปริมาณออกซิเจนในช่วงที่มีการสัมผัส (Scheffer and UIlstrup, 1965) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Yoder and Scheffer (1981) พบว่า HC toxin กระตุ้นให้กระบวนการ nitrate reduction เพิ่มขึ้น โดยมีการนำเข้า (uptake) NO_3^- สู่เนื้อเยื่อพืชมากขึ้น ภายหลังจากใบข้าวโพดได้รับ HC toxin เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ Rasmussen and Scheffer (1988) พบว่า HC toxin ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ในใบข้าวโพด


บริเวณที่เนื้อเยื่อพืชถูก
ย่อยสลาย
C
15kV X2,000
10µm 160938

ภาพที่ 9 Conidia (C) ของเชื้อรา *B. cactivora* ที่ยึดเกาะบนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร หลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง มีการย่อยสลายเนื้อเยื่อบริเวณรอบที่สัมผัสกับ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM)

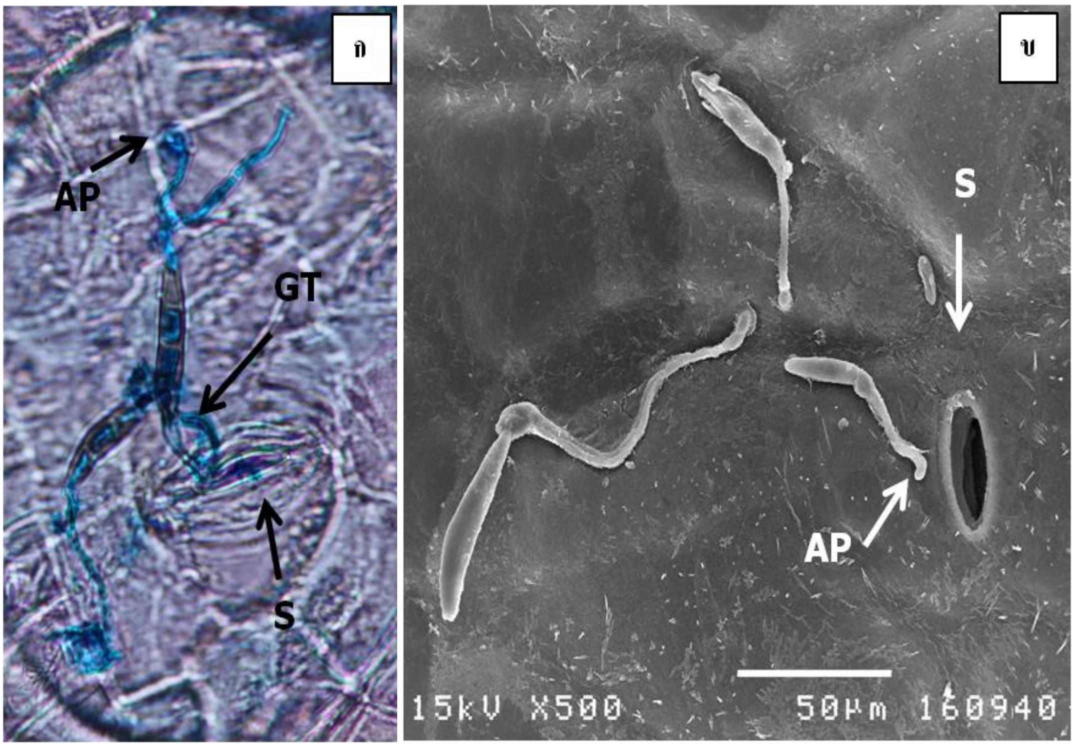

AP
C
GT
AP
บริเวณที่เนื้อเยื่อพืช
ถูกย่อยสลาย
15kV X2,000
10µm 160937

ภาพที่ 10 ลักษณะการเกาะยึดของ conidia เชื้อรา *B. cactivora* และมีการย่อยสลายเนื้อเยื่อผิวผลบริเวณรอบที่สัมผัสกับ conidia หลังการปลูกเชื้อ เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM)

การเข้าทำลายผลแก้วมังกรของเชื้อรา *B. cactivora* ภายใต้การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope และ scanning electron microscope (SEM) พบว่าเชื้อรา *B. cactivora* สามารถเข้าทำลายพืชได้โดยตรงและผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ (ปากใบ) ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยเส้นใยของเชื้อราสร้าง appressoria เพื่อสร้างเส้นใยเข้าทำลายทั้งบริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์บนเนื้อเยื่อพืชและบริเวณใกล้เคียงกับปากใบ นอกจากนี้ยังสามารถงอกเส้นใยเพื่อเข้าทำลายปากใบได้โดยตรง ซึ่งการเข้าทำลายในลักษณะนี้คล้ายคลึงกับเชื้อรา *H. carbonum* สาเหตุโรค leaf spot ในข้าวโพด ที่สามารถเข้าทำลายใบข้าวโพดสายพันธุ์อ่อนแอได้โดยตรงและทางปากใบ ซึ่งเป็นช่องเปิดธรรมชาติภายหลังการปลูกเชื้อ 12 ชั่วโมง โดยเชื้อรางอก germ tube สร้าง appressoria และสร้างเส้นใยเพื่อใช้ในการแทงเข้าเนื้อเยื่อของใบข้าวโพด ตามลำดับ จากนั้นมีการเพิ่มจำนวนของเส้นใยมากขึ้นและแผ่ขยายปกคลุมเนื้อเยื่อใบ ส่งผลให้เกิดการสร้าง conidiophores และ conidia ที่ปรากฏบนใบข้าวโพดภายหลังการปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง (Comstock and Scheffer, 1972)

Wheeler (1977) ศึกษากระบวนการเข้าทำลายของเชื้อรา *H. maydis* ในใบข้าวโพด พบว่า ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 6 ชั่วโมง เชื้อราเริ่มสร้าง appressoria โดยส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ผิวพืชและบริเวณใกล้เคียงกับปากใบ ซึ่งส่งผลให้บริเวณนั้นเกิดการแยกตัวหรือแตกหัก กระบวนการบุกรุกเข้าสู่พืช (penetration) เริ่มเกิดขึ้นภายหลังจากการปลูกเชื้อ 8-10 ชั่วโมง โดยเชื้อรางอกและสร้าง appressoria จากนั้นจะสร้างเส้นใยจำนวนมาก แผ่ขยายไปทั่วเนื้อเยื่อพืชบริเวณใต้ชั้น epidermal cell ต่อมาจึงสร้างเส้นใยที่เป็นโครงสร้างพิเศษเรียกว่า haustoria โดยจะดันเข้าไปในผนังเซลล์พืช เพื่อใช้ดูดซึมสารอาหารต่างๆ ซึ่งโครงสร้างนี้พบได้เฉพาะเชื้อราที่เป็นปรสิต

Rodriguez *et al.* (1996) รายงานถึง ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ conidia งอกและเกิดกระบวนการเข้าทำลายพืชคือ ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) สูง ประมาณ 85-100 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิระหว่าง 2-27 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *H. solani* ยังสามารถสร้าง conidia ในที่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิต่ำได้ และการพัฒนาของโรคยังคงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง แต่อาจเกิดขึ้นอย่างช้าๆ สอดคล้องกับ Morton (1962); Nema and Joshi (1973) รายงานว่า ภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงประมาณ 100 เปอร์เซ็นต์ จะส่งเสริมให้เชื้อรา *D. sorokiniana* สร้างเส้นใย และสร้าง conidia จำนวนมาก ทำให้เกิดการก่อตัวกันอย่างหนาแน่นบริเวณที่เชื้อเข้าทำลาย



ภาพที่ 11 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *B. cactivora* บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร หลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

ก. Conidia งอก germ tube (GT) เพื่อใช้ในการเข้าทำลายปากใบ (S) ของพืชโดยตรง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 400X

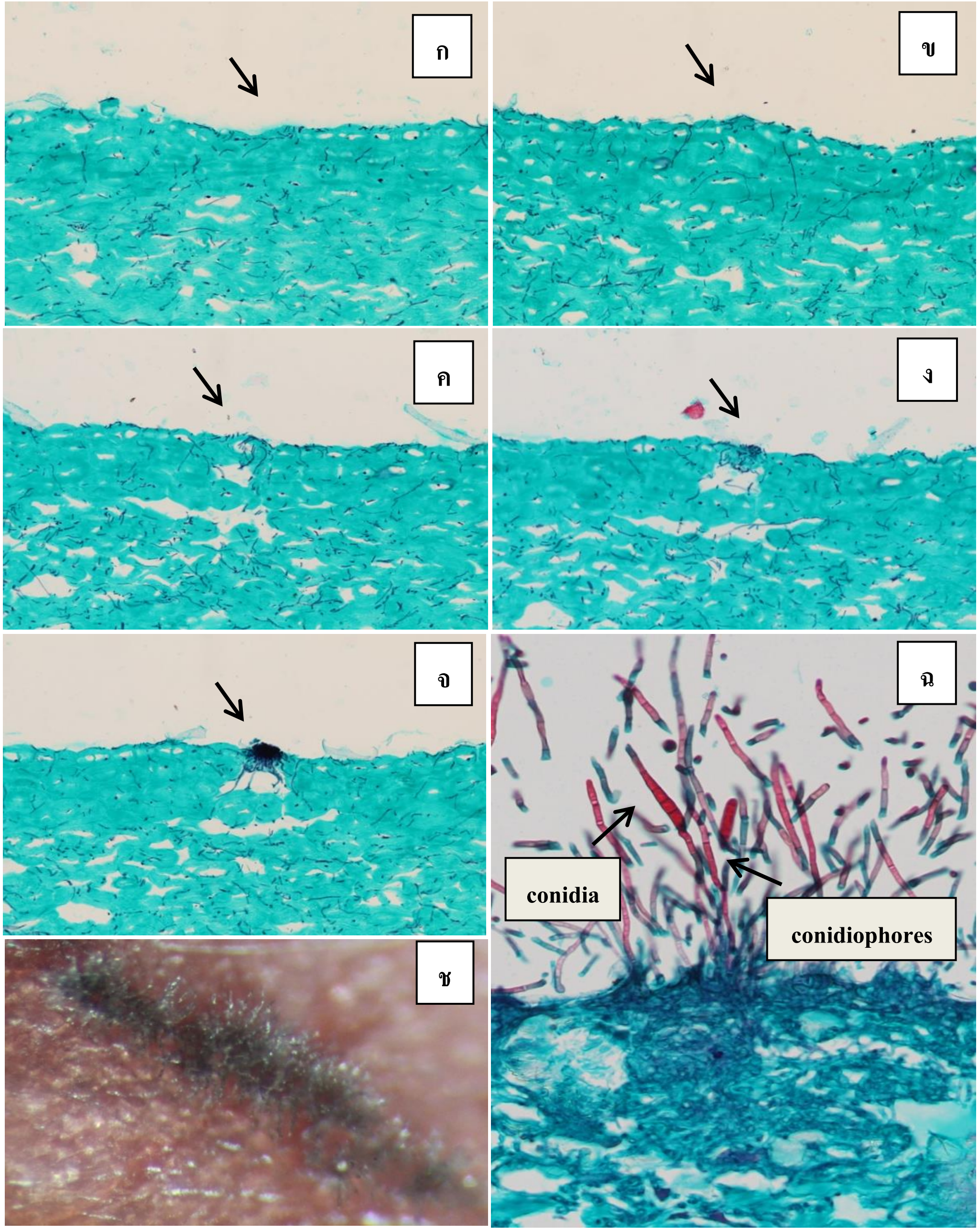
ข. Conidia สร้าง appressoria (AP) บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์บนเนื้อเยื่อพืช และบริเวณใกล้เคียงกับปากใบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ scanning electron microscope (SEM)

3.3 การเข้าทำลายในเนื้อเยื่อผล (Microtome sectioning)

จากการนำเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร ภายหลังการปลูกเชื้อด้วยสารแขวนลอย conidia ของ *B. cactivora* แล้วบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน จึงนำมาตัดด้วยวิธี microtome sectioning แล้วย้อมสีด้วย safranin o และ fast green พบว่า เนื้อเยื่อของผลแก้วมังกรติดสีเขียวของ fast green และโครงสร้างของเชื้อรา เช่น เส้นใย conidia และ conidiophores ติดสีแดงของ safranin o จากการศึกษาครั้งนี้เห็นได้ว่า ภายหลังจาก conidia เชื้อรา *B. cactivora* ตกลงสู่ผิวผลแก้วมังกร มีการยึดเกาะและเข้าสู่กระบวนการเข้าทำลาย โดยสร้างสารหรือเอนไซม์ต่างๆ มาย่อยสลายเนื้อเยื่อพืชรอบๆ conidia แล้ว เชื้อราจะสร้างเส้นใยและมีการแตกแขนงออกเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้ในการบุกรุก (invade) เข้าสู่เซลล์พืช เส้นใยมีการเพิ่มจำนวนและแผ่กระจายไปทั่วเนื้อเยื่อ เพื่อครอบครอง (colonize) เซลล์พืช โดยเส้นใยเหล่านี้เกิดการรวมกลุ่มเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า conidiophores ทำหน้าที่เป็นก้านชู conidia ซึ่ง conidia สร้างบริเวณส่วนปลายของ conidiophores (ภาพที่ 12) จากการรวมกลุ่มของเส้นใยจำนวนมาก เพื่อสร้างโครงสร้างในการขยายพันธุ์ของเชื้อรา ส่งผลให้เซลล์พืชบริเวณผิวผลเกิดการแยกตัวหรือสูญเสียสมดุล และปรากฏ conidia ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นกลุ่มสีดำอย่างชัดเจน บริเวณแผลที่แสดงอาการของโรคผลเน่า

Rashid and Neergaard (1996) รายงานว่า เชื้อรา *B. sorokiniana* (*Cochliobolus sativus*) จะสร้างเส้นใยทั้งบริเวณภายในเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ แผ่กระจายทั่วทั้งเนื้อเยื่อของต้นกล้าข้าวสาลีที่มีอายุ 7 วัน ซึ่งระหว่างกระบวนการเข้าทำลาย เชื้อรามีการพัฒนาและครอบครองพื้นที่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ส่งผลให้ต้นกล้าบริเวณที่เชื้อเข้าทำลายแสดงอาการเปลี่ยนสี เนื้อเยื่อตาย และเน่าในที่สุด ส่วน Aggarwal *et al.* (2008) พบว่า เนื้อเยื่อใบของข้าวสาลีภายหลังการปลูกเชื้อด้วย *B. sorokiniana* 4 วัน มีการเจริญและพัฒนาของเส้นใยเชื้อรา โดยเนื้อเยื่อรอบๆ เกิดการเสื่อมสภาพและสูญเสียความสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังเกิดการแยกตัวของ plasmalemma เนื่องจาก chloroplast ถูกย่อยสลาย ภายหลังการปลูกเชื้อ 5 วัน สอดคล้องกับ Mower and Millar (1963) รายงานการศึกษาลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อรา *Drechslera sorokiniana* (Sate.) Subram. and Jain (*H. sativum* P.B. and K.) ในหญ้าพันธุ์ Kentucky bluegrass พบว่า เส้นใยของเชื้อราที่ถูกสร้างขึ้นส่งผลให้เกิดการสลายตัวของ chloroplast ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นแตกหรือแยกออกจากกัน จนในที่สุดระบบการทำงานของเซลล์พืชเสียสมดุลหรือหยุดชะงัก

กระบวนการเข้าทำลายพืชของเชื้อสาเหตุโรค ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ซึ่งนอกจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม สภาพอากาศที่เหมาะสม และความชื้นสัมพัทธ์สูงแล้ว ยังประกอบด้วยความรุนแรงของเชื้อสาเหตุโรค ระยะการเจริญเติบโตของพืช ลักษณะด้อยของพันธุ์พืช รวมทั้งลักษณะพื้นที่ที่ปลูกพืช ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีความสำคัญในการส่งเสริมให้เชื้อสาเหตุโรคสามารถเข้าทำลายพืชได้อย่างประสบผลสำเร็จ (Bazlur *et al*., 1983) เช่นเดียวกับรายงานของ Krist *et al.* (2004) อธิบายถึงปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลให้เชื้อสาเหตุโรคเข้าทำลายพืชได้อย่างสมบูรณ์ ได้แก่ พืชอาศัยต้องอยู่ในระยะที่อ่อนแอหรือเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุโรคนั้นๆ ในขณะเดียวกันเชื้อสาเหตุโรคต้องมีจำนวนมากและมีความรุนแรงพอที่ทำให้พืชเป็นโรค และบริเวณที่เชื้อสัมผัสกับพืชต้องเป็นเนื้อเยื่อปกติ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยด้านอื่นๆ เช่น แหล่งอาหาร (Agnew and Koella, 1999) ลักษณะพื้นที่ (Sousa and Grosholz, 1991) และระยะการเจริญเติบโตของพืช (Richards, 1977; Altaif *et al*., 1989) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อพืชอาศัยเจริญเติบโตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การขาดน้ำ การขาดแร่ธาตุอาหาร หรือมีการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืช จะส่งผลให้พืชอาศัยอ่อนแอง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค (Jokela *et al*., 2000)



ภาพที่ 12 ลักษณะการเจริญและพัฒนาของเชื้อรา *B. cactivora* บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร ด้วยวิธีการ microtome sectioning เนื้อเยื่อมีความหนา 12 ไมครอน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope กำลังขยาย 200X

ก-จ. การรวมกลุ่มของเส้นใยเชื้อรา *B. cactivora* ภายในเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร

ฉ. ลักษณะ conidiophores และ conidia ของเชื้อราที่เกิดจากการรวมกลุ่มของเส้นใย

ช. กลุ่ม conidia บนเนื้อเยื่อผลแก้วมังกร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope

4. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำร้อนในการควบคุมโรค

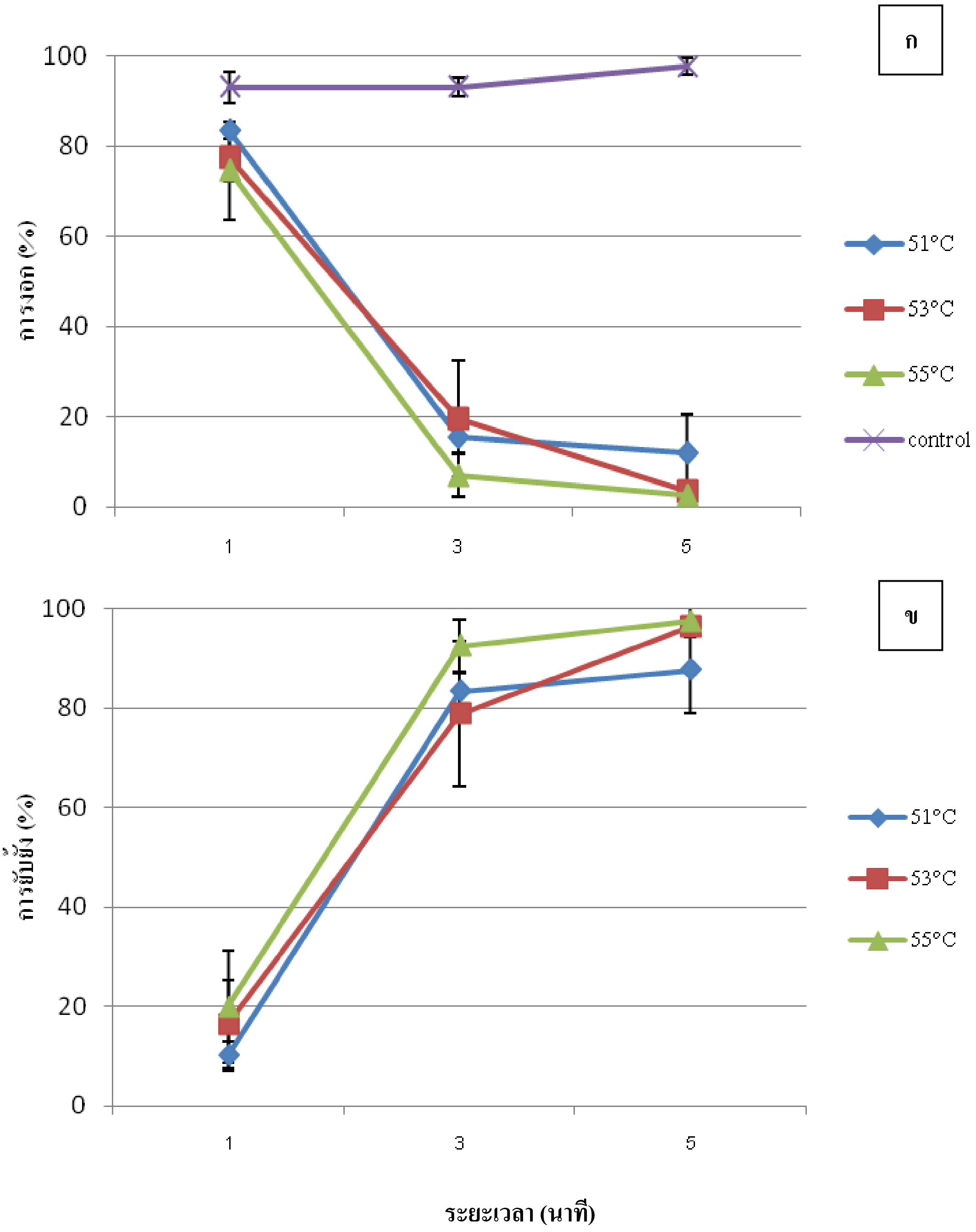
4.1 ศึกษาผลของน้ำร้อนในการยับยั้งการงอกของ conidia เชื้อรา

Conidia เชื้อรา *B. cactivora* เมื่อสัมผัสน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาที ตามลำดับ แล้วเกลี่ยลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่งผลต่อการงอกของ conidia ดังแสดงในภาพที่ 13 ซึ่งอุณหภูมิของน้ำร้อน และระยะเวลาการจุ่มที่สูงขึ้น ทำให้การงอก conidia ลดลงตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 53 และ 55 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการงอก conidia ได้ดีกว่าอุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส และการจุ่ม conidia ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถยับยั้งการงอกได้สูงสุดเฉลี่ย 97.42 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับระยะเวลาเดียวกันที่อุณหภูมิ 51 และ 53 องศาเซลเซียส คล้ายคลึงกับ Sopee (2005) รายงานการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำร้อนอุณหภูมิ 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส ต่อการงอกของ conidia เชื้อรา *C. gleosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงน้ำดอกไม้ โดยการจุ่ม conidia ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สามารถยับยั้งการงอกของ conidia ได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อนำ conidia ที่เจริญบนเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค จุ่มในอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 และ 10 นาที พบว่า สามารถลดความงอกของ conidia ได้เหลือเพียง 1-4 เปอร์เซ็นต์

Strano *et al.* (2014) รายงานผลของการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที สามารถยับยั้งการงอกของ conidia เชื้อรา *P. digitatum* ที่เจริญอยู่บนผิวของผลส้มพันธุ์ Tarocco และเป็นสาเหตุโรค green mold ในพืชตระกูลส้ม โดยน้ำร้อนอุณหภูมิดังกล่าว ยับยั้งการงอกของ conidia ได้ดีกว่าการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 วินาที ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิสูงแต่ระยะเวลาสั้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของ conidia เชื้อราได้ดีกว่าการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิต่ำแต่ระยะเวลานาน คล้ายคลึงกับ Liu *et al.* (2012) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำร้อนต่อการงอกและการยืดยาวของ conidia เชื้อรา *M. fructicola* พบว่า เมื่อจุ่ม conidia ของเชื้อราลงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 และ 10 นาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ส่งผลให้การงอกและการยืดยาวของ conidia ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อบ่มเป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง พบว่า เปอร์เซ็นต์การงอกของ conidia ไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่า การใช้น้ำร้อน

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 และ 10 นาที เป็นการชะลอการเจริญเติบโตของ conidia ของเชื้อรา *M. fructicola* ทั้งนี้ Civello *et al.* (1997) รายงานว่าเส้นใยของเชื้อรารวมทั้ง conidia ส่วนใหญ่เมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิสูง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที จะส่งผลต่อระบบการทำงานภายในเซลล์หยุดชะงักหรือผิดปกติ

การใช้น้ำร้อนอุณหภูมิสูง เป็นหนึ่งในวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ที่มีผลต่อทั้งพืชและเชื้อสาเหตุโรค (Schirra *et al.*, 2000; Pavoncello *et al.*, 2001) โดยส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคโดยตรง (Jemric *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008) โดย Barkai-Golan and Phillips (1991) รายงานว่า ความร้อนมีผลต่อเชื้อสาเหตุโรคโดยอาจส่งผลให้โปรตีนเกิดการเสื่อมสภาพ ทำให้กระบวนการทำงานของเอนไซม์ผิดปกติหรือถูกทำลาย มีการปลดปล่อยไขมันที่ผิดปกติ เนื้อเยื่อถูกทำลาย กระบวนการสะสมอาหารสูญเสียสมดุลและระบบการเผาผลาญต่างๆ ถูกทำลาย เป็นต้น ซึ่งเหล่านี้อาจเกิดขึ้นพร้อมกันหรือเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง นอกจากนี้ Abrashev *et al.* (2008); Liu *et al.* (2011) พบว่า เมื่อเชื้อราสัมผัสกับอุณหภูมิที่สูง จะส่งผลให้เกิดสภาวะเครียด ซึ่งทำให้มีการสะสมของ reactive oxygen species (ROS) ภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง Helmerhorst *et al.* (1999); Prabhakaran *et al.* (2005) รายงานเพิ่มเติมว่า เมื่อระดับของ ROS ไม่สมดุล mitochondria ที่เป็นโครงสร้างหลักทำหน้าที่เกี่ยวกับ ROS จึงทำงานผิดปกติ และระดับ ATP ลดลงในที่สุด



ภาพที่ 13 ผลของการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาที ต่อการงอกและการยับยั้ง (%) ของ conidia เชื้อรา *B. cactivora*

ก. การงอก (%) ของ conidia เชื้อรา *B. cactivora*

ข. การยับยั้ง (%) ของconidia เชื้อรา *B. cactivora*

4.2 ศึกษาการใช้น้ำร้อนในการควบคุมโรคบนผลแก้วมังกร

4.2.1 การทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกร ด้วยวิธีการนำผลแก้วมังกรที่ผ่านการปลูกเชื้อ และบ่มในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วจุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่า อุณหภูมิของน้ำร้อนที่สูงขึ้นส่งผลยับยั้งการเกิดโรคเพิ่มขึ้น โดยการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้สูงที่สุด เท่ากับ 55.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 51 และ 53 องศาเซลเซียส เท่ากับ 46.5 และ 50.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้ว พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 14) สอดคล้องกับรายงานของ ศรายุทธและสมศิริ (2556) ทดสอบการควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกร ที่เกิดจากเชื้อรา *D. dominicana* ด้วยการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สามารถลดการเกิดโรคได้มากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

บูรณี (2548) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำร้อนในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* สาเหตุโรคเน่าราสีเขียวของส้มสายน้ำผึ้ง พบว่า การแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 52 54 56 และ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ทำให้มีการเน่าเสียของผลส้มลดลงเมื่ออุณหภูมิน้ำร้อนสูงขึ้น โดยสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 37.5 53.3 74.2 87.5 และ 95.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Hong *et al.* (2007) ทดสอบการใช้น้ำร้อนโดยการจุ่มผลส้มลงในอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที พบว่าสามารถลดการเกิดโรคผลเน่าของส้มได้ดี นอกจากนี้ Margosan *et al.* (1997) ทดลองจุ่มลูกพีชในน้ำร้อนอุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 นาที พบว่า สามารถลดการเกิดโรค Brown rot ภายหลังการเก็บเกี่ยว ที่เกิดจากเชื้อรา *M. fructicola* และ *Rhizopus stolonifer* เช่นเดียวกับ Jemric *et al.* (2011) พบว่า การใช้น้ำร้อน 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที ภายหลังการปลูกเชื้อรา *M. laxa* 24 ชั่วโมง สามารถลดการเกิดโรค Brown rot บนลูกพีชและ nectarine ในระหว่างการเก็บรักษา โดยไม่ส่งผลใดๆ ต่อคุณภาพผล

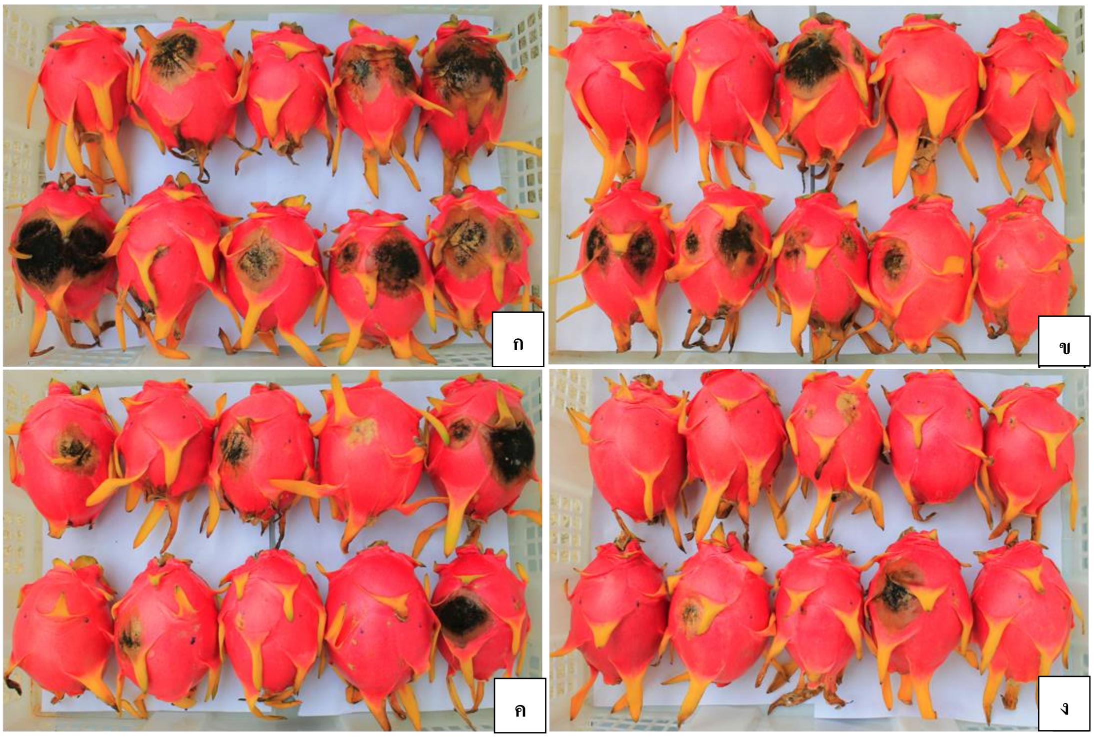
เนื่องจากการใช้น้ำร้อน 55 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่สูงจนเกินไป จึงส่งผลให้แก้วมังกรเกิดกระบวนการสุกที่รวดเร็ว และผลมีสีแดงเข้มขึ้นอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิอื่นๆ ซึ่งดนัย (2549) รายงานว่า การใช้ความร้อนที่สูงเกินไป จะส่งผลต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อมากมาย เช่น กระบวนการสุกของผลไม้ การหายใจ การพัฒนาสี การสังเคราะห์เอทิลีน เป็นต้น ซึ่งภายหลังจากผ่านความร้อนแล้วต้องทำให้อุณหภูมิต่ำทันที เนื่องจาก

ความร้อนที่สะสมอยู่บนผลผลิตเป็นเวลานานๆ มีผลให้สรีระของพืชเปลี่ยนแปลงไป เช่น สุกหรือเน่าเร็วขึ้น (จริงแท้, 2538) นอกจากนี้ Droby *et al.* (2008); Strano *et al.* (2014) พบว่าการจุ่มผลไม้ในน้ำร้อนอุณหภูมิสูง 56 องศาเซลเซียส มีผลต่อ essential oil ที่อยู่บนผิวผล โดยส่งผลให้สารประกอบต่างๆ ที่ส่งเสริมการงอกของ conidia เชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* มีปริมาณลดลง คือสารประกอบพวก monoterpene hydrocarbons เช่น aslimonene α-pinene และ myrcene ขณะที่การใช้น้ำร้อนอุณหภูมิดังกล่าว ส่งเสริมให้เกิดการสร้างสารประกอบพวก oxygenated monoterpenes และ aliphatic (fatty) aldehydes เพิ่มขึ้น ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของ conidia เชื้อราทั้ง 2 ชนิด

ตารางที่ 2 ปริมาณการยับยั้งการเกิดโรค (%) ผลเน่าแก้วมังกร ที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ภายหลังการจุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

กรรมวิธี	การยับยั้ง (%) 1/
น้ำอุณหภูมิห้อง	0.0b
น้ำร้อนอุณหภูมิ 51°C	46.5a
น้ำร้อนอุณหภูมิ 53°C	50.9a
น้ำร้อนอุณหภูมิ 55°C	55.2a

1/ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan’s New Multiple Range Test



ภาพที่ 14 ประสิทธิภาพของน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในการควบคุมโรคผลเน่าแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ภายหลังการปลูกเชื้อและบ่มในสภาพชื้น เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

ก. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง (ชุดควบคุม)

ข. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส

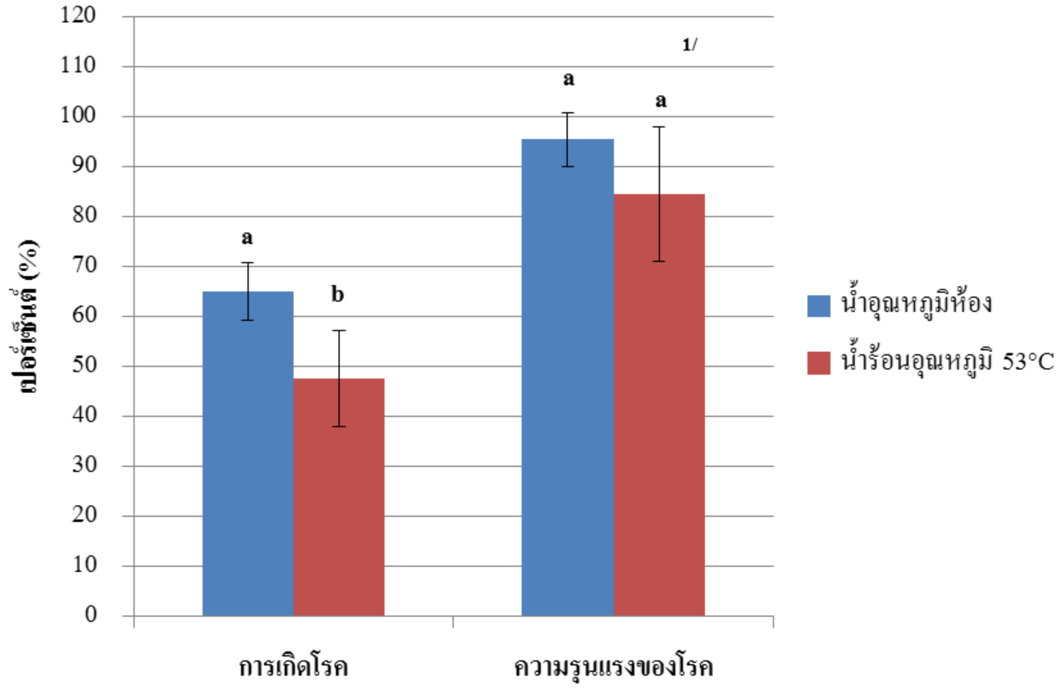
ค. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส

ง. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

4.2.2 ผลการทดสอบการใช้น้ำร้อนเพื่อควบคุมการเกิดโรคผลเน่าแก้วมังกร นำผลแก้วมังกรที่ปลูกเชื้อรา *B. cactivora* แล้วบ่มในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ดีจากการทดลองที่ 4.2.1 และไม่ทำให้ผลแก้วมังกรเกิดอาการเสียหายเนื่องจากความร้อน (heat injury) จากนั้นจึงจุ่มในน้ำเย็นทันที พบว่า การเกิดโรคของผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เท่ากับ 47.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับผลแก้วมังกรชุดควบคุม ที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง พบการเกิดโรคเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ สำหรับความรุนแรงของโรค พบว่า ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เท่ากับ 84.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับผลแก้วมังกรชุดควบคุม พบความรุนแรงของโรคเท่ากับ 95.4 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 15) คล้ายคลึงกับรายงานของ Li *et al.* (2013) จุ่มผลมะละกอลงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ส่งผลให้เชื้อรา *C. gleosporioides* ที่เจริญอยู่บริเวณผิวผลมะละกอลดลงอย่างชัดเจน และยับยั้งการเกิดโรคแอนแทรคโนสและโรค stem rot นอกจากนี้ยังช่วยชะลอการอ่อนนิ่มของผล แต่ส่งผลให้กระบวนการเปลี่ยนสีของผลช้าลง

Sopee and Sangchote (2005) รายงานการใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีสามารถกำจัดเชื้อรา *C. gleosporioides* ที่เจริญอยู่บริเวณผิวผลของมะม่วงน้ำดอกไม้ที่ระดับลึก 1 มิลลิเมตรได้ 80 เปอร์เซ็นต์ และลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วงน้ำดอกไม้ได้ 93 เปอร์เซ็นต์ และธัญมน (2554) จุ่มผลลองกองด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 47 และ 49 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที สามารถลดการเกิดโรคผลเน่าได้ 39.7 57.8 และ 46.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มน้ำอุณหภูมิห้อง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ทั้งยังลดการร่วงของผลได้ 25.4 32.2 และ 47.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการควบคุมโรคผลเน่าของลองกอง

การใช้น้ำร้อนในการควบคุมโรคผลเน่าแก้วมังกรภายหลังการเก็บเกี่ยว ถึงแม้จะเป็นวิธีที่ไม่สามารถควบคุมโรคผลเน่าได้อย่างสมบูรณ์ แต่ก็ช่วยลดหรือชะลอการเกิดโรคได้ ฉะนั้นจึงเป็นทาง เลือกหนึ่งในการจัดการโรคที่ประหยัดต้นทุน สะดวก ไม่มีสารพิษตกค้างบนผลผลิต อีกทั้งยังปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ผู้ผลิต และผู้บริโภค



ภาพที่ 15 การเกิดโรคและความรุนแรง (%) ของโรคผลเน่าแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง

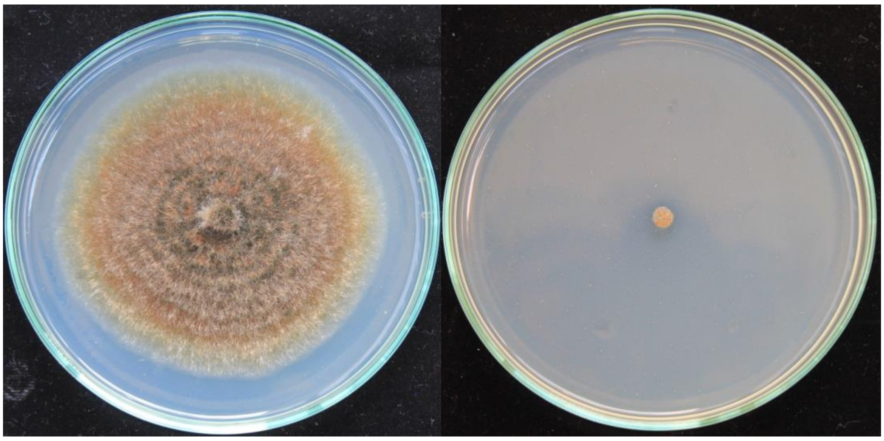
[1/] ค่าเฉลี่ยในแผนภูมิแท่งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Levene's Test for Equality of Variances

5. ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีและการใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรค

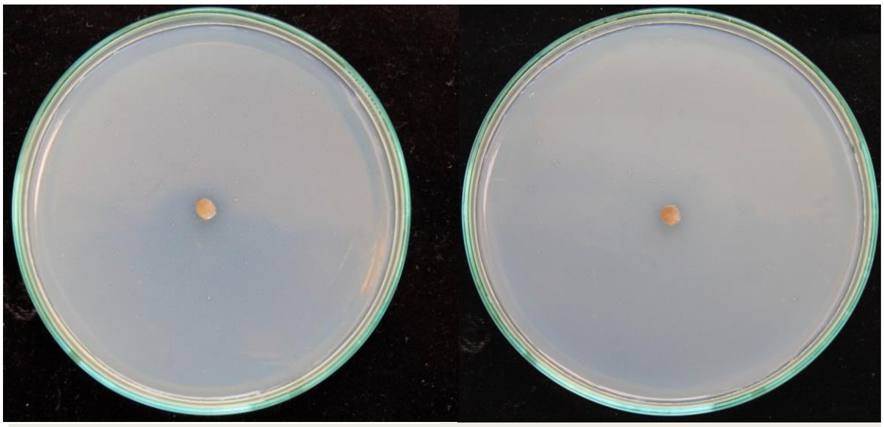
5.1 ศึกษาผลของสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมี 3 ชนิดคือ imazalil prochloraz ความเข้มข้น 250 500 750 ppm และ difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 75 150 225 ppm ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. cactivora* ภายในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี poisoned food technique พบว่า สารเคมีทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. cactivora* ได้อย่างสมบูรณ์ โดยสารเคมี difenoconazole สามารถยับยั้งได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 37.5 ppm ขึ้นไป (ภาพที่ 16) สำหรับ imazalil และ prochloraz สามารถยับยั้งได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 250 ppm ขึ้นไป (ภาพที่ 17, 18) คล้ายคลึงกับ Reuveni and Sheglov (2002) รายงานการใช้สารเคมี difenoconazole ที่ระดับความเข้มข้น EC_{50} และ EC_{95} ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria alternata* สาเหตุโรคผลเน่าใน red apple พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อราได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 0.8 และ 12 µg/ml ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสารเคมี azoxystrobin polyoxin B และ trifloxystrobin นอกจากนี้การจุ่มผลแอปเปิล ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/ml หลังจากการปลูกเชื้อ 6 และ 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการพัฒนาโรคผลเน่าบนแอปเปิลได้ดี และ Begum *et al.* (2014) ศึกษาผลของการใช้สารเคมี difenoconazole และสารเคมีอื่นๆ ที่ระดับความเข้มข้น 500 1000 1500 ppm ด้วยวิธี poisoned food technique พบว่า สารเคมี difenoconazole มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สาเหตุโรค stem rot ในพริก ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตั้งแต่ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm เช่นเดียวกับสารเคมี carboxin propioconazole hexaconazole และ carbendazim นอกจากนี้ ศรายุทธ (2556) ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งเชื้อรา *D. dominicana* สาเหตุโรคผลเน่าแก้วมังกรในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี poisoned food technique โดยสารเคมี prochloraz ความเข้มข้น 200 300 และ 400 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 95.4 94.1 และ 95.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าสารเคมี mancozeb และ carbendazim ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

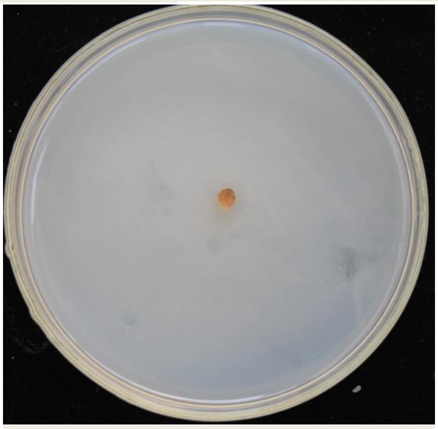
จากผลการทดลองข้างต้น จึงคัดเลือกสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้ม 37.5 ppm เพื่อการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร เนื่องจาก เป็นสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ แม้ใช้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ



Difenoconazole 0 ppm **Difenoconazole 37.5 ppm**

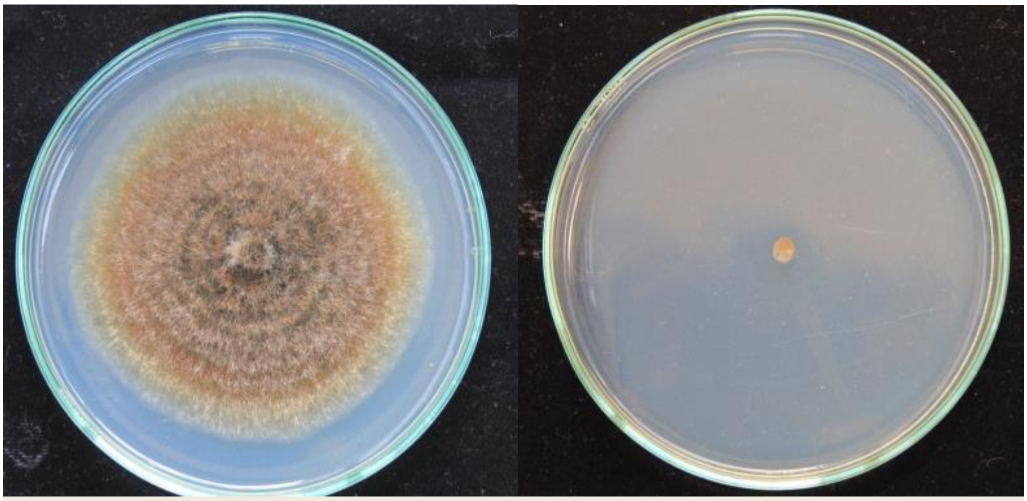


Difenoconazole 75 ppm ppm **Difenoconazole 150 ppm**

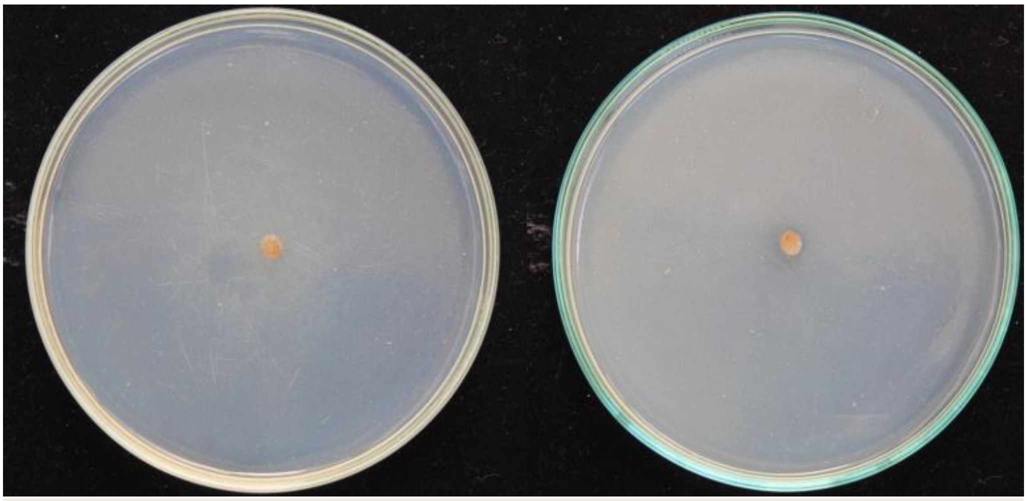


Difenoconazole 225 ppm

ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพของสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 0 37.5 75 150 และ 225 ppm โดยวิธี poisoned food technique ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

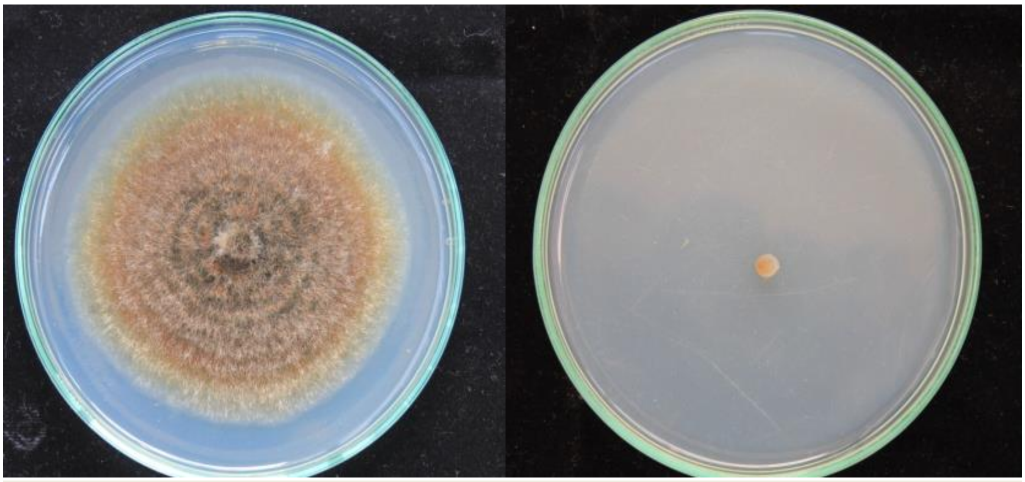


Imazalil 0 ppm **Imazalil 250 ppm**

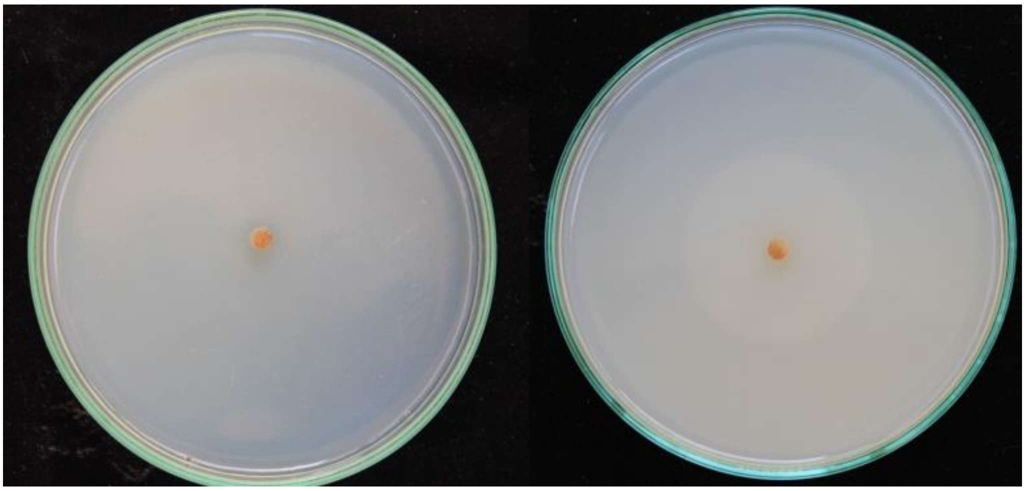


Imazalil 500 ppm **Imazalil 750 ppm**

ภาพที่ 17 ประสิทธิภาพของสารเคมี imazalil ความเข้มข้น 0 250 500 และ 750 ppm โดยวิธี poisoned food technique ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน



Prochloraz 0 ppm **Prochloraz 250 ppm**



Prochloraz 500 ppm **Prochloraz 750 ppm**

ภาพที่ 18 ประสิทธิภาพของสารเคมี prochloraz ความเข้มข้น 0 250 500 และ 750 ppm โดยวิธี poisoned food technique ภายใต้แสง near ultraviolet สลับมืด 12 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

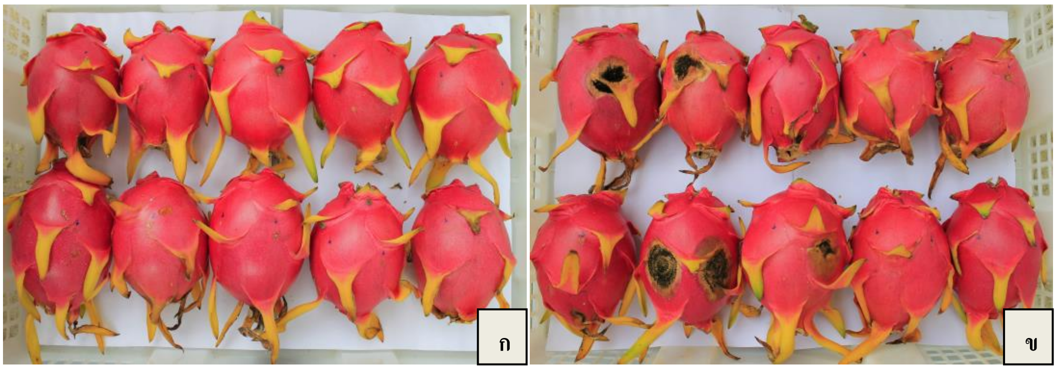
5.2 ศึกษาผลของสารเคมีกำจัดเชื้อราต่อการเกิดโรคผลเน่า

ผลการใช้สารเคมี difenoconazole ในการควบคุมโรคผลเน่า โดยนำผลแก้วมังกรที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* และบ่มในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole ที่ความเข้มข้น 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที พบว่า ภายหลังการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สารเคมี difenoconazole สามารถควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มในน้ำอุณหภูมิห้อง ซึ่งพบการเกิดโรคเท่ากับ 32 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 19) Batta (2001) รายงานการใช้สารเคมี difenoconazole ในการป้องกันโรค black spot ของลูกพลับพบว่า ภายหลังการปลูกเชื้อรา *A. alternata* และทดสอบด้วยวิธี paper disc difenoconazole ที่ระดับความเข้มข้น EC_{250} สามารถยับยั้งการพัฒนาของแผลบนผลลูกพลับได้ดี โดยแผลมีการพัฒนาเฉลี่ยเพียง 1 มิลลิเมตร จึงส่งผลให้การเกิดโรค black spot ของลูกพลับน้อยลง เมื่อเทียบสารเคมีชนิดอื่น

Vawdrey *et al.* (2008) พบว่า สารเคมี difenoconazole มีประสิทธิภาพการควบคุมโรค black spot ของมะละกอที่เกิดจากเชื้อรา *Asperisporium caricae* ได้ดี ทั้งการจุ่มผลโดยตรงและการฉีดพ่นลงบนผลมะละกอ โดยสามารถลดการเกิดโรคได้ 99 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ สารเคมี difenoconazole ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราที่ก่อโรคบนข้าวสาลี ดังการรายงานของ Liu *et al.* (2003) ทดสอบประสิทธิภาพของการใช้สารเคมี difenoconazole ในอัตรา 200 มิลลิลิตรต่อข้าวสาลี 100 กิโลกรัม พบว่า มีผลในการควบคุมเชื้อรา *Gaeumannomyces graminis* ทำให้อัตราการเกิดโรคในระยะต้นกล้าลดลง อีกทั้งยังกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นอ่อนข้าวสาลี และส่งผลให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

สารเคมี difenoconazole เป็นสารเคมีที่สามารถใช้ในการรักษาและป้องกันโรคพืช สามารถควบคุมเชื้อราในกลุ่ม ascomycetes, basidiomycetes และ imperfect fungi ได้อย่างกว้างขวาง โดยส่งผลในการรบกวนการสังเคราะห์ ergosterol ซึ่งจะไปยับยั้ง C-14-demethylation ของ sterol ที่เป็นส่วนสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์เชื้อรา ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง สูญเสียความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่าน และการทำงานเปลี่ยนแปลงไป (European Food Safety Authority, 2012)

ทั้งนี้การใช้สารเคมีในการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ส่วนมากจะเป็นกลุ่มสารเคมีสังเคราะห์ หากใช้เป็นระยะเวลานานเชื้อสาเหตุโรคจะเกิดการต้านทานหรือดื้อต่อสารเคมีนั้นๆ เกษตรกรจึงต้องใช้สารเคมีในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งจะต้องคำนึงถึงผลกระทบต่อผู้บริโภคด้วย เนื่องจากสารเคมีทุกชนิดมีสารพิษตกค้าง และหากปริมาณสารพิษตกค้างบนผลผลิตเกินค่ามาตรฐานที่ CODEX กำหนด อาจเป็นพิษต่อผู้บริโภคและไม่สามารถส่งออกผลผลิตนั้นไปยังต่างประเทศได้ ฉะนั้น การเลือกใช้สารเคมีที่มีปริมาณสารพิษตกค้างต่ำ จึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับผลิตผลทางการเกษตร



ภาพที่ 19 ประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีในการควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกร หลังจากการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* และบ่มในสภาพชื้น 18 ชั่วโมง ก่อนจุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ก. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที

ข. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง (ชุดควบคุม)

5.3 ศึกษาการใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรค

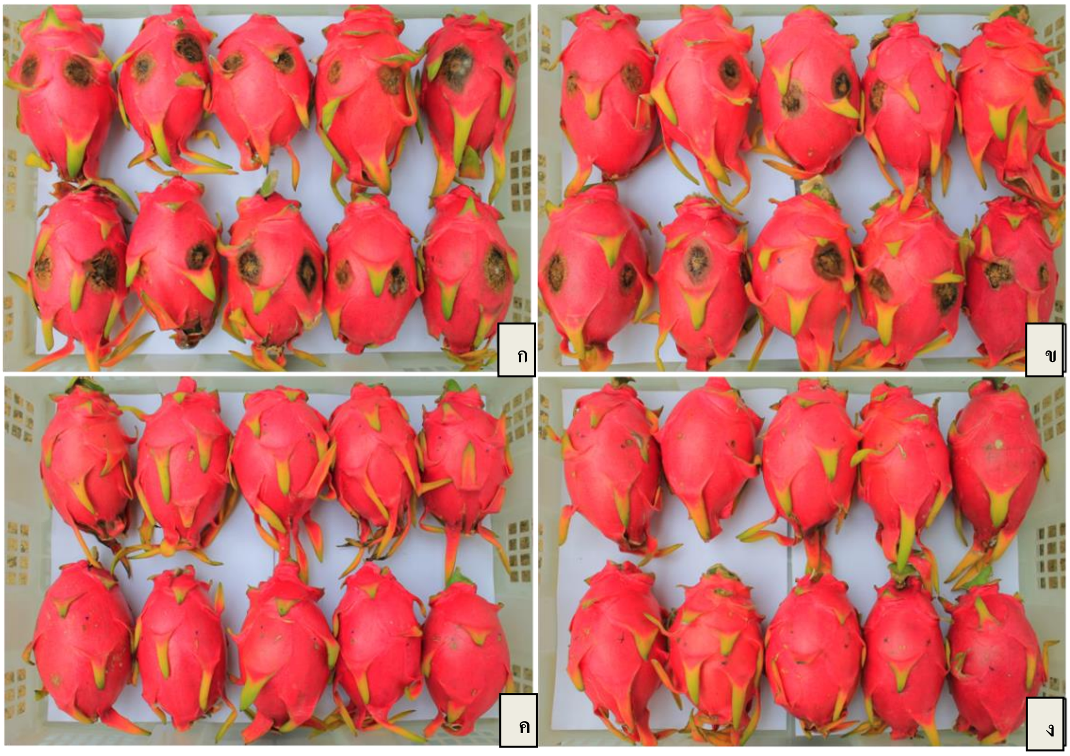
การจุ่มผลแก้วมังกรด้วยสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สามารถควบคุมโรคผลเน่าแก้วมังกรที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการจุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที เพียงอย่างเดียว ขณะที่การจุ่มน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบการเกิดโรค 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม ที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง พบการเกิดโรค 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 20) Abdule *et al.* (2011) ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีร่วมกับน้ำร้อนต่อคุณภาพของผลมะม่วงและการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าการใช้ Topsin-M ปริมาตร 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ช่วยลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะม่วง และการใช้ NaOCl ปริมาตร 2.5 กรัมต่อน้ำ 10 ลิตรและ Topsin-M ปริมาตร 1 กรัมต่อลิตร ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ยังส่งผลให้ระดับ total titratable acidity (TTA) สูงขึ้น Om and Pandey (2000) ศึกษาการควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงโดยการใช้น้ำร้อนและสารเคมี พบว่า การจุ่มผลมะม่วงในสารเคมี carbendazim และ thiophanate-methyl ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลมะม่วงได้นาน 26 วันและ 19 วัน ที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Schirra and Mulas (1995) รายงานว่า การใช้น้ำร้อนร่วมกับสารเคมีเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการชะลอการเกิด chilling injury และยังสามารถลดการเกิดโรค ที่อาจเกิดจากอาการ chilling injury ซึ่งการจุ่มผลส้มพันธุ์ Taracco ในร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส ร่วมกับสารเคมี thiabendazole ที่ระดับความเข้มข้น 1500 ppm เป็นเวลา 3 นาที เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าภายหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างดี เมื่อเทียบกับการจุ่มในน้ำร้อนหรือสารเคมีเพียงอย่างเดียว

การใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนภายหลังการเก็บเกี่ยว เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคผลเน่าของแก้วมังกร ได้ดีเช่นเดียวกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และใช้ระยะเวลาในการจุ่มผลเพียง 1 นาที ซึ่งสั้นกว่าการจุ่มสารเคมี ที่ใช้ระยะเวลาจุ่มผลนาน 3 นาที ทั้งนี้ ระยะเวลาการจุ่มผลที่สั้น ช่วยให้ปริมาณสารพิษตกค้างน้อย ฉะนั้น การเลือกใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณสารพิษตกค้างบนผลผลิต

ตารางที่ 3 การเกิดโรคผลเน่า (%) บนผลแก้วมังกรที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาจุ่มด้วยน้ำร้อนร่วมสารเคมี difenoconazole แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

กรรมวิธี	การเกิดโรค (%) [1/]
น้ำอุณหภูมิห้อง	95.0a
น้ำร้อนที่ 53°C เป็นเวลา 1 นาที	80.0b
Difenoconazole 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที	0.0c
Difenoconazole 37.5 ppm + น้ำร้อนอุณหภูมิ 53°C เป็นเวลา 1 นาที	0.0c

[1/] ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีวิเคราะห์ Duncan’s New Multiple Range Test



ภาพที่ 20 การเกิดโรคผลเน่า (%) บนผลแก้วมังกรที่ได้รับการปลูกเชื้อรา *B. cactivora* และบ่มไว้ในสภาพชื้น เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาผ่านด้วยวิธีการต่างๆ จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ก. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำอุณหภูมิห้อง (ชุดควบคุม)

ข. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ค. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที

ง. ผลแก้วมังกรที่จุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

6. การตรวจสารพิษตกค้างของสารเคมีบนผลแก้วมังกร

การส่งตรวจสารพิษตกค้างของผลแก้วมังกร ที่บริษัทห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ด้วยวิธี In-house method based on QuEChERs method ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ตามวิธีการของ Barganska *et al.* (2014) ภายหลังการจุ่มด้วยสารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที แล้วบ่มไว้อุณหภูมิห้องนาน 5 วันพบว่า มีปริมาณ difenoconnazole 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากขณะนี้ไม่มีรายงานค่ามาตรฐานสารพิษตกค้าง (MRL) ที่กำหนด ให้มีในอาหารของ Codex บนผลแก้วมังกร จึงได้เปรียบเทียบสารพิษตกค้างของ difenoconazole ที่มีบนผลไม้ชนิดอื่น ซึ่งเหล่านี้เป็นผลไม้ที่รับประทานเปลือกไม่ได้เช่นเดียวกับแก้วมังกร เช่น กล้วย มีค่า MRL เท่ากับ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มะม่วงเท่ากับ 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และเสาวรสเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งศรายุทธ (2556) ได้รายงานค่าสารพิษตกค้างของ prochloraz หลังจากจุ่มผลแก้วมังกรที่ความเข้มข้น 400 ppm เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และ Rueegg and Siegfried (1996) ทดสอบการฉีดพ่นสารเคมี difenoconazole (Score 10 WP) และ penconazole (Topas C) เพื่อควบคุมโรค scab และราแป้งในสวนแอปเปิล และเพื่อตรวจสารพิษตกค้างที่มีบนใบแอปเปิล บนหญ้าที่เจริญอยู่รอบๆ และในดิน พบว่า สารพิษตกค้างมีปริมาณสูงภายหลังจากการฉีดพ่นสารเคมีทันที โดยส่วนใหญ่ difenoconazole มีค่าสูงกว่า penconazole และหลังจากการใช้เป็นเวลานาน 2 ปี ไม่พบการสะสมของสารเคมีทั้ง 2 ชนิดในดิน นอกจากนี้ Zhang *et al.* (2015) ตรวจสอบสารพิษตกค้างบนเมล็ดข้าวสาลี ภายหลังการฉีดพ่นด้วย difenoconazole 28 วัน พบว่า มีค่าน้อยกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคตามมาตรฐานของ Good Agricultural Practices (GAP)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการสำรวจโรคผลเน่าแก้วมังกรในพื้นที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร และอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย พบว่า เชื้อรา *Bipolaris cactivora* เป็นอีกสาเหตุหนึ่งของโรคผลเน่าแก้วมังกร ลักษณะอาการของโรคที่แสดงออกบนผล ในระยะแรกเกิดแผลจุดฉ่ำน้ำ เนื้อเยื่อยุบ ตัวลงเล็กน้อยและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลฟางข้าว หลังจากนั้น 2 วันเชื้อราสร้าง conidiophores และ conidia ถูกสร้างขึ้นบนส่วนปลายของ conidiophores ลักษณะเป็นกลุ่มสีดำขึ้นปกคลุมบริเวณแผล แผลขยายใหญ่ขึ้นและลามไปยังเนื้อเยื่อผลส่วนอื่นๆ อย่างรวดเร็ว

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *B. cactivora* พบ conidiophores เกิดขึ้นรวมกันเป็นกลุ่ม สีน้ำตาลอ่อน ลักษณะตั้งตรงหรืออาจโค้งงอเล็กน้อย และมีผนังกั้นอย่างชัดเจน conidia มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างคล้ายกระสวย โค้งงอเล็กน้อย ภายในมีผนังกั้น 2-4 septate ลักษณะหัวท้ายมน และสามารถงอก germ tube ได้ทั้ง 2 ด้าน (bipolar germination) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีทางโมเลกุลพบว่า ไอโซเลตจากแหล่งปลูกอำเภอภูเรือ จังหวัดเลย คล้ายคลึงกับเชื้อรา *B. cactivora* accession no. KF 039902 และ GU 390882 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรายงานว่า เป็นเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของแก้วมังกร

กระบวนการเข้าทำลายของเชื้อรา *B. cactivora* พบว่า conidia เริ่มงอก germ tube และสร้าง appressoria ภายหลังการปลูกเชื้อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และมีแนวโน้มการสร้างเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการบ่มในสภาพชื้น การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ SEM พบว่า *B. cactivora* สร้าง appressorium ได้ทั้งบริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์บนเนื้อเยื่อพืชบริเวณใกล้เคียงกับปากใบ และงอกเส้นใยเพื่อเข้าทำลายปากใบได้โดยตรง แสดงให้เห็นว่า *B. cactivora* สามารถเข้าทำลายพืชได้โดยตรงและผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ (ปากใบ) ภายหลังจากที่เชื้อรา *B. cactivora* เข้าสู่พืช จะสร้างเส้นใยและมีการแตกแขนงออกเป็นจำนวนมาก เส้นใยมีการเพิ่มจำนวนและแผ่กระจายไปทั่วเนื้อเยื่อทั้งภายในเซลล์และช่องว่างระหว่างเซลล์ ต่อมาเกิดการรวมกลุ่มเป็นโครงสร้าง conidiophores ทำหน้าที่เป็นก้านชู conidia ส่งผลให้เซลล์พืชบริเวณผิวผลเกิดการแยกตัว และปรากฏ conidia ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นกลุ่มสีดำอย่างชัดเจนบริเวณแผลที่แสดงอาการของโรคผลเน่า

การใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาที ส่งผลต่อการงอกของ conidia โดยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีสามารถยับยั้งการงอกได้สูงสุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับที่อุณหภูมิอื่น ซึ่งอุณหภูมิของน้ำร้อนและระยะเวลาการจุ่มที่สูงขึ้น ทำให้การงอก conidia ลดลง ตามลำดับ

การควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกร โดยการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อลดการเกิดโรคผลเน่าของแก้วมังกร และไม่ทำให้ผลแก้วมังกรแสดงอาการเสียหายเนื่องจากความร้อน (heat injury) เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้วพบว่า การใช้น้ำร้อนทั้ง 3 อุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราภายในห้องปฏิบัติการโดยวิธี poisoned food technique โดยใช้สารเคมี 3 ชนิดได้แก่ imazalil prochloraz ความเข้มข้น 250 500 750 ppm และ difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 75 150 225 ppm พบว่าสารเคมีทั้ง 3 ชนิด ทุกระดับความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *B. cactivora* ได้อย่างสมบูรณ์

การใช้สารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm จุ่มผล เป็นเวลา 3 นาที สามารถควบคุมโรคผลเน่าของแก้วมังกรหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างสมบูรณ์ และการตรวจสารพิษตกค้างที่ผลแก้วมังกร มีค่าเท่ากับ 0.07 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

การใช้สารเคมี difenoconazole ความเข้มข้น 37.5 ppm ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สามารถลดการเกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

โรคผลเน่าของแก้วมังกรภายหลังการเก็บเกี่ยว สามารถควบคุมได้หลายวิธี ทั้งการใช้สารเคมี การใช้น้ำร้อน หรือการใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อน ซึ่งวิธีการเหล่านี้ต่างก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป สารเคมีถึงแม้จะมีประสิทธิภาพควบคุมโรคได้อย่างสมบูรณ์ แต่หากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมและบ่อยครั้ง จะส่งผลให้มีพิษตกค้างบนผลแก้วมังกร การใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อน กระบวนการอาจมีความยุ่งยาก แต่เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณสารพิษตกค้างบนผล เนื่องจากระยะเวลาในการจุ่มผลสั้นกว่าการจุ่มสารเคมีเพียงอย่างเดียว ทั้งยังควบคุมโรคได้อย่างสมบูรณ์ ฉะนั้นการนำวิธีการควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวมาประยุกต์ใช้ ต้องคำนึงถึงความปลอดภัยทั้งต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งสำคัญ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนา สุทธิกุล. 2548. เทคโนโลยีเรื่องแก้วมังกรผลไม้ที่ยังได้เรื่องได้ราวอยู่. **เคหการเกษตร** 29 (1): 73-83.

จริงแท้ ศิริพานิช. 2538. **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิรา ณ หนองคาย. 2535. **เทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยวผักผลไม้และดอกไม้**. สำนักพิมพ์แมสพับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ชิดชนก เกษี และ สมศิริ แสงโชติ. 2556. การเข้าทำลายและควบคุมโรคแอนแทรคโนสของผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw.) Brit. & Rose.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd. & P. Syd.) E. J. Blutler & Bisby. **วิทยาศาสตร์เกษตร** 44 (3พิเศษ): 25-28.

ดนัย บุณยเกียรติ. 2549. **โรคหลังเก็บเกี่ยวของผักและผลไม้**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

ธัญมน สังข์ศิริ. 2554. **ชีววิทยาของการเข้าทำลาย การเกิดโรค การควบคุมโรคปื้นดำและโรคผลเน่าของลองกอง (*Aglaia dookkoo* Griff.) ในระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิดดา หงส์วิวัฒน์ และ ทวีทอง หงส์วิวัฒน์. 2550. **แก้วมังกรใน ผลไม้ 111 ชนิด: คุณค่าอาหารและการกิน**. สำนักพิมพ์แสงแดด, กรุงเทพฯ.

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์. 2548. **การควบคุมโรคเน่าราสีเขียวของส้มสายน้ำผึ้งที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ด้วยการใช้น้ำร้อนและสารเคมีควบคุมเชื้อรา imazalil หลังการเก็บเกี่ยว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประเทือง สง่าวงศ์. 2538. **โรคพืชวิทยา**. สถาบันเทคโนโลยีเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่.

เปรมปรี ณ. สงขลา. 2542. แก้วมังกรอิสราเอล. **เคหการเกษตร** 23 (11): 95-98.

พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช พจนา ตระกูลสุขรัตน์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ บูรณี พั่ววงศ์แพทย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และอมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2550. **ศึกษาการจัดการโรคพืชที่เหมาะสมในการผลิตแก้วมังกร**.สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

รัตติรส เชียงสิน. 2553. **การเข้าทำลายใบองุ่นของเชื้อรา *Colletotrichum gleosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสและความสัมพันธ์ระหว่างการเข้าทำลายใบและผลองุ่นในสภาพแปลงปลูก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สายชล เกตุษา. 2528. **สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยวผักผลไม้**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุจิรา รวมเงาะ. 2543. **การควบคุมโรคผลเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา *Lasiodiplodia theobromae, Colletotrichum gloeosporioides* และ *Phomopsis* sp. หลังการเก็บเกี่ยว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรพงษ์ โกสิยะจินดา. 2540 . แก้วมังกร. **เคหการเกษตร** 21 (10): 62-68.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2551. **สารพิษตกค้าง: ปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด**. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/residue_limits.pdf, 15 มิถุนายน 2556.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2552. **ค่าสารพิษตกค้าง (MRL) ที่กำหนดให้มีในอาหารของ Codex**. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/codexMRL.php, 15 มิถุนายน 2556.

ศรายุทธ สอนวิลัย. 2556. **โรคผลเน่าของแก้วมังกรภายหลังการเก็บเกี่ยวและการควบคุม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศรายุทธ สอนวิลัย และ สมศิริ แสงโชติ. 2556. การเข้าทำลายผลแก้วมังกร (*Hylocereus undatus* (Haw) Brit. & Rose.) ที่เกิดจากเชื้อรา *Dothiorella dominicana* Pet. et. Cif. และการควบคุม. **วิทยาศาสตร์เกษตร** 44 (3พิเศษ): 18-21.

Abdule, J., A.U. Malik, Islam-ud-din, R. Anwar, M. Ayub, I.A. Rajwana, M. Amin, A.S. Khan and M. Saeed. 2011. Effect of combined application of fungicides and hot water quarantine treatment on postharvest disease and quality of mango fruit. **Pakiston Journal of Botany** 43 (1): 65-73.

Abrashev, R.I., S.B. Pashova, L.N. Stefanova, S.V. Vassilev, P.A. Dolashka-Angelova and M.B. Angelova. 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. **Canadian Journal of Microbiology** 54: 977-983.

Aggarwal, R., S. Das, M. Jahani and D.V. Singh. 2008. Histopathology of spot blotch disease of wheat caused by *Bipolaris sorokiniana* (Teleomorph: *Cochliobolus sativus*). **Acta Phytophatologica et Entomologica Hungarica** 43: 23-30.

Agnew, P. and J.C. Koella. 1999. Life history interactions with environmental conditions in a host-parasite relationship and the parasite's mode of transmission. **Evolutionary Ecology** 0: 67-89.

Albersheim, P., T.M. Jones and P.D. English. 1969. Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. **Annual Review of Phytopathology** 7: 171-194.

Alcorn, J.L. 1983. Genetic concepts in *Drechslera*, *Bipolaris* and *Exserohilum*. **Mycotaxon** 17: 1-86.

Altaif, K.I., A.J. Al-Zubaidy, M.K. Abbas and H.M. Al-Mashhadani. 1989. Factors affecting infectivity and development of larval stages of the liver fluke *Fasciola gigantica* in the snails *Lymnae auricularia* complex. **Helminthologica** 26: 211-218.

Barganska, Z., M. Slebioda and J. Namiesnik. 2014. Determination of pesticide residues in honeybees using modified QUEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Molecules** 19: 2911-2924.

Barkai-Golan, R. and D.J. Phillips. 1991. Postharvest heat treatment of fresh fruits and vegetables for decay control. **Plant Disease** 75: 1085-1089.

Bateman, D.F.and H.G. Basham. 1976. Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. **Physiological Plant Pathology** 4: 316-355.

______ and R.L. Millar. 1966. Pectic enzymes in tissue degradation. **Annual Review of Phytopathology** 4: 119-146.

Batta, Y.A.. 2001. Effect of fungicides and antagonistic microorganisms on the black fruit spot disease on persimmon. **Agricultural Sciences** 28: 2-3.

Bazlur, R., A.Q.M., G.A. Fakir and I. Hossain. 1983. Studies on leaf blight in Bangladesh. **Bangladesh Journal of Agricuhural Sciences** 10: 49-57.

Begum, A., M.S. Dadke, S.S. Wagh, D.P. Kuldhar, D.V. Pawar, A.A. Chavan and D.S. Thaware. 2014. *In vitro* evaluation of fungicides and botanicals against stem rot of chilli caused by *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Plant Protection** 7 (3): 437-40.

Ben-Yehoshua, S. 1985. Individual seal-packaging of fruit in plastic film, a new postharvest technique. **Horticultural Science** 20: 32-37.

Brent, K.J. and D.W. Hollomon. 2007. **Fungicide Resistance in Crop Pathogens: how can it be managed**. Fungicide Resistance Action Committee. UK.

Butler, M.J. and A.W. Day. 1998. Destruction of fungal melanins by ligninases of *Phanerochaete chrysosporium* and other white rot fungi. **International Journal of Plant Sciences** 159: 989-995.

Carlson, H., U. Stenram, M. Gustafsson and H.B. Jansson. 1991. Electron microscopy of barley root infection by the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana*. **Canadian Journal of Botany** 69: 2724-2731.

Chau, N.M. 1998. **Dragon fruit in Vietnam**. บรรยาย 26 มิ.ย. 2541. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.

Civello, P.M., G.A. Martinez, A.R. Chavas and M.C. Anon. 1997. Heat treatments delay ripening and postharvest decay of strawberry fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 45: 4589-4594.

Comstock, J.C. and R.P. Scheffer. 1972. Role of host-selective toxin in colonization of corn leaves by *Helminthosporium carbonum*. **Phytopathology** 63: 24-29.

Danderson, M. 1986. Omega (Prochloraz), a fungicide for post-harvest control of anthracnose, the *Dothiorella*/*Colletotrichum* complex and stem-end rot in avocado. **South African Avocado Grower's Association Yearbook** 9: 27-30.

Demel, R.A. and B. de Kruijff. 1976. The function of sterols in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta** 457: 109-132.

Denner, F.D.N., C. Millard, A. Geldenhuys and F.C. Wehner. 1997. Treatment of seed potatoes with prochloraz for stimultaneous control of silver scurf and black dot on progeny tubers. **Potato Research** 40 (2): 221-227.

Droby, S., A. Eick, L. Macarisin, L. Cohen, G. Rafael, R. Stange, G. Mc Colum, N. Dudai, A. Nasser, M. Wisniewski and R. Shapira. 2008. Role of citrus volatiles in hostrecognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **Postharvest Biology and Technology** 49: 386-396.

Durbin, R.D., L.H. Davis and K.F. Baker. 1955. **A** Helminthosporium stem rot of cacti. **Phytopathology** 45: 509–512.

Eckert, J.W. and J.M. Ogawa. 1985. The chemical control of postharvest diseases: subtropical and tropical fruits. **Annual Review of Phytopathology** 23: 421-454.

______and N.F. Sommer. 1967. Control of disease of fruits and vegetables by postharvest treatment. **Annual Review of Phytopathology** 59: 391-432.

Edney, K.L. and R.T. Burchill. 1967. The use of heat to control the rotting of Cox's Orange Pippin apples by *Gloeosporium* spp. **Annals of Applied Biology** 59: 389-400.

Ellis, M.B. 1971. **Dematiaceous Hyphomycetes**. Commonwealth Mycological Institute: Kew, Surrey, UK.

El Bassam, S., N. Benhamou and O. Carisse. 2002. The role of melanin in the antagonistic interaction between the apple scab pathogen *Venturia inaequalis* and *Microsphaeropsis ochracea*. **Canadian Journal of Microbiology** 48: 349-358.

European Food Safety Authority. 2012. Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for difenoconazole in raspberries, blackberries and cucurbits (edible peel). **EFSA Journal** 8: 2867.

Evans, R.C. and H. Stempen. 1986. Localization of protein in the hyphal sheath of *Bipolaris maydis* race T. **Phytopathology** 76: 792-794.

______, ______and S.J. Stewart. 1981. Development of hyphal sheaths in *Bipolaris maydis* race T. **Canadian Journal of Botany** 59: 453-459.

Gibson, A.C. and P.S. Nobel. 1986. **The Cactus Primer**. Harvard University Press, Cambridge.

Gopinath, K., N.V. Radhakrishnan and J. Jayaraj. 2006. Effect of propiconazole and difenoconazole on the control of anthracnose of chilli fruits caused by *Colletotrichum capsici*. **Crop Protection** 25: 1024-1031.

He, P.F., H. Ho, X.X. Wu, M.S. Hou and Y.Q. He. 2012. *Bipolaris cactivora* causing fruit rot of dragon fruit imported from Vietnam. **Plant Pathology & Quarantine** 2 (1): 31-35.

Heiny, D.K. and G.A. McIntyre. 1983. *Helminthosporium solani* Dur. & Mont. development on potato periderm. **American Potato Journal** 60: 773-789.

Helmerhorst, E.J., P. Breeuwer, W. van't Hof, E. Walgreen-Weterings, L.C.J.M. Oomen, E.C.I. Veerman, A.V.N. Amerongen and T. Abee. 1999. The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. **The Journal of Biological Chemistry** 274: 7286-7291.

Hong, S.I., H.H. Lee and D. Kim. 2007. Effect of hot water treatment on the storage stability of Satsuma mandarin as a postharvest decay control. **Postharvest Biology and Technology** 43: 271-279.

Houck, Y., B.J. Deverall and B.L. Wild. 1993. Biology control postharvest orange disease by a strain of *Pseudomonas cepacia* under semi-commercial conditions. **Postharvest Biology and Technology** 3: 293-304.

Houck, L.G. 1967. Hot water treatment for control of *Penicillium digitatum* green mold of Eureka Lemon. **Phytopathology** 57: 99-105.

Hussein, H.S. and J.M. Brasel. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology** 167 (2): 101-34.

Jackson, L.S. and F. Al-Taher. 2008. Factors Affecting Mycotoxin Production in Fruits, pp.75-104. *In* R. Barkai-Golan and N. Paster, eds. **Mycotoxins in Fruits and Vegetables**. USA:Elsevier, San Diego.

Jecobs, D. 1999. **Pitaya (*Hylocereus undatus*), a potential new crop for Australia**. The Australian New Crops Newsletter No. 11.

Jemric, T., D. Ivic, G. Fruk, H.S. Matijas, B. Cvjetkovic, M. Bupic และ B. Pavkovic. 2011. Reduction of postharvest decay of peach and nectarine caused by *Monilinia laxa* using hot water dipping. **Food and Bioprocess Technology** 4 (1): 149-154.

Jokela, J., P. Schmid Hempel and M.C. Rigby. 2000. Dr. Pangloss restrained by the Red Queen - steps towards a unified defence theory. **Oikos** 89: 267-274.

Israel, B.Z, A. Issac, L. Edna and E. Genya. 2011. First report of *Bipolaris cactivora* causing fruit blotch and stem rot of dragon fruit (pitaya) in Israel. **Phytoparasitica** 39: 195-197.

Karp, D. 2002. **Purple, Spiny and Heading Your Way**. Los Angeles September 18. H1.

Krist, A.C., J. Jokela, J. Wiehn and C.M. Lively. 2004. Effects of host condition on susceptibility to infection, parasite developmental rate, and parasite transmission in a snail–trematode interaction. **Evolutionary Biology** 17: 33-40.

Kuba, Y., I. Furusawa and J. Shishiyama. 1987. Relation between pigment intensity and penetrating ability in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **Canadian Journal of Microbiology** 33: 870-873.

Li, X., X. Zhu, N. Zhao, D. Fu, J. Li, W. Chen and W. Chen. 2013. Effects of hot water treatment on anthracnose disease in papaya fruit and its possible mechanism. **Postharvest and biotechnology** 86: 437-446.

Liu Y., H. Lü and H. Du. 2003. Studies on difenoconazole controlling *Gaeumannomyces graminis* of wheat. **Pesticides** 42: 34-35.

Liu, J., Y. Sui, M. Wisniewski, S. Droby, S. Tian, J. Norelli and V. Hershkovitz. 2012. Effect of heat treatment on inhibition of *Monilinia fructicola* and induction of disease resistance in peach fruit. **Postharvest Biology and Technology** 65: 61-68.

______, M. Wisniewski, S. Droby, S. Tian, V. Hershkovitz and T. Tworkoski. 2011. Effect of heat shock treatment on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Metschnikowia fructicola*. **FEMS Microbiology Ecology** 76: 145-155.

Lurie, S., J.D. Klein and R.B. Arie. 1990. Postharvest heat treatment as a possible means of reducing superficial scald of apple. **Horticultural Science** 65: 503-509.

Margosan, D.A., J.L. Smilanick, G.F. Simmons and D.J. Henson. 1997. Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. **Plant Disease** 81: 1405-1409.

Marie-Thérèse, E.T., G. Boudart and B. Dumas. 2000. Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry** 38: 157-163.

Martinez, C., D. Rioux and R.J. Tweddell. 2004. Ultrastructure of the infection process of potato tuber by *Helminthosporium solani*, causal agent of potato silver scurf. **Mycological Research** 108 (7): 828-836.

Mizrahi,Y., A. Nerd and P.S. Nobel. 1997. Cacti as Crops. **Horticultural Reviews** 18: 291-320.

Morton, D.J. 1962. Influence of temperature, humidity, and inoculum concentration on development of *Helminthosporium sativum* and *Septoria passerinii* in excised barley leaves. **Phytopathology** 52: 704-708.

Mower, R.G. and R.L. Millar. 1963. Histological relationships of *Helminthosporiutn vagans*, *H. sativum*, and *Curvularia lunata* in leaves of Merion and common Kentucky bluegrass. **Phytopathology** 53: 351.

Neergaard, E.D. 1997. **Methods in Botanical Histopathology**. Kandrups Bogtrykkeri, Copenhagen, Denmark.

Nema, K.G. and L.M. Joshi. 1973. Spot-blotch disease of wheat in relation to host age, temperature and moisture. **Indian Phytopathology** 26: 41-48.

Nerd, A. and Y. Mizrahi. 1997. Reproductive biology of cactus fruit crops. **Horticultural Reviews** 18: 321-346.

Nicole, M., K. Ruel and G.B. Ouellette. 1994. Fine morphology of fungal structures involved in host wall alteration, pp. 13-30. *In* O. Petrini and G.B. Ouellette, eds. **Host Wall Alterations by Parasitic Fungi**. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.

Om, P. and B.K. Pandey. 2000. Control of mango anthracnose by hot water and fungicide treatment. **Indian Phytopathology** 53 (1): 92-94.

Porter, F.M. 1966. Protease activity in diseased fruits. **Phytopathology** 56**:** 1424-1425.

Pavoncello, D., S. Lurie, S. Droby and R. Porat. 2001. A hot water treatment induces resistance to *Penicillium digitatum* and promotes the accumulation of heat shock and pathogenesis-related proteins in grapefruit flavedo. **Physiologia Plantarum** 111: 17-22.

Prabhakaran, K., L. Li, E.M. Mills, J.L. Borowitz and G.E. Isom. 2005. Up-regulation of uncoupling protein 2 by cyanide is linked with cytotoxicity in mesencephalic cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** 314: 1338-1345.

Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology** 34: 413-434.

______and R.A. Pumbley. 1992. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruits, pp. 289-307. *In* J.A. Bailey and M.J. Jeger, eds. ***Colletotrichum*****: Biology, Pathology and Control**. CAB International, UK.

Rashid, A. Q.M.B. and E. Neergaard. 1996. Histopathological behaviour of seedborne *Bipolaris sorokiniana* in wheat seedlings. **Bangladesh Journal of Plant Pathology** 12: 5-8.

Rasmussen, J.B. and R.P. Scheffer. 1988. Effects of selective toxin from *Helminthosporium carbonum* on chlorophyll synthesis in maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 32: 283-291.

Reuveni. M. and D. Sheglov. 2002. Effects of azoxystrobin, difenoconazole, polyoxin B (polar) and trifloxystrobin on germination and growth of *Alternaria alternata* and decay in red delicious apple fruit. **Crop Protection** 21: 951-955.

______, ______, N. Sheglov, R. Ben-Arie and D. Prusky. 2002. Sensitivity of Red Delicious apple fruit at various phenologic stages to infection by *Alternaria alternata* and moldy-core control. **European Journal of Plant Pathology** 108: 421-427.

Rodriguez, D.A., G.A. Secor, N.C. Gudmestad and L.J. Francl. 1996. Sporulation of *Helminthosporium solani* and infection of potato tubers in seed and commercial storages. **Plant Disease** 80: 1063-1070.

Richards, C.S. 1977. *Schistosoma mansoni* : susceptibility reversal with age in the snail host *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology** 42: 165–168.

Rueegg, J. and W. Siegfried. 1996. Residues of difenoconazole and penconazole on apple leaves and grass and soil in an apple orchard in north-eastern Switzerland. **Crop Protection** 15(1): 27-31.

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. Chain sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 74: 5463-5467.

Scheffer, R.P. and A.J. Ullstrup, 1965. A host-specific toxin metabolite from *Helminthosporium carbonum.* **Phytopathology** 65: 1037-1038.

Schirra, M. and M. Mulas. 1995. Improving storability of ‘Tarocco’ oranges by postharvest hot-dip fungicide treatments. **Postharvest Biology and Technology** 6: 129-138.

______, G.D. hallewin, S. Ben-Yehoshua and E. Fallik. 2000. Host–pathogen interactions modulated by heat treatment. **Postharvest Biology and Technology** 21: 71-85.

Smith, G. 2002. **Dragon Fruit Lights Fire Among Growers**. San Diego Union Trbune. October 10. C1.

Sopee, J. 2005. **Effect of heat treatment on Anthracnose disease of mangoes cv. Nam Dok Mai**. Master Thesis, Kasetsart University.

______and S. Sangchote. 2005. Effect of heat treatment on the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* and antracnose of mango fruit. **Acta Horticulturae** 628: 2049-2056.

Sousa, W.P. and E.D. Grosholz. 1991. The influence of habitat structure on the transmission of parasites, pp. 300-324. *In* S.A. Bell, E.D. McCoy and H.R. Mushinsky, eds. **Habitat Structure: the Physical Arrangement of Objects in Space**. Chapman and Hall, London.

Spalding, D.H. 1982. Resistance of mango pathogens to fungicides used to control postharvest disease. **Plant Disease** 66 (12): 1185-1186.

Spotts, R.A. 1984. Environment modification for control of postharvest decay, pp. 67-72. *In* H.E. Moline, ed. **Postharvest Pathology of Fruits and Vegetables: Postharvest Losses in Perishable crops**. Berkeley, University of California Bulletin.

Strano, M.C., M. Calandraa, V. Aloisia, P. Rapisardaa, T. Strano and G. Rubertob. 2014. Hot water dipping treatments on Tarocco orange fruit and their effects on peel essential oil. **Postharvest Biology and Technology** 94: 26-34.

Taba, S., N. miyahira and K. Nasu. 2007. Fruit rot of Strawberry pear (pitaya) caused by *Bipolaris cactivora*. **Journal General of Plant Pathology** 73: 374-376.

Takano, Y., Y. Kubo, C. Kawamura, T. Tsuge and I. Furusawa. 1997. The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene restores appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in the melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium*. **Fungal Genetics and Biology** 21: 131-140.

Tarnowski, T.L.B, A.J. Palmateer and J.H. Crane. 2010. First report of fruit rot on *Hylocereus undatus* caused by *Bipolaris cactivora* in South Florida. **Plant Disease** 94: 1506.

Thuy, N.N. and H.T. Duc. 1999. Fruit fly management at the preharvest stage: problems and progress. **ACIAR Postharvest Newsletter** 50: 11. Quality Assurance in Agricultural Produce 50 (1999): Abstract No. 20.

To, Le V., N. Ngu, N.D. Duc, D.T.K. Trinh, N.C. Thanh, D.V.H. Mein, C.N. Hai and T.N. Long. 2000. Quality assurance system for dragon fruit, pp. 101-114. *In* G.I. Johnson, L.V. To, N.D. Duc, and M.C. Webb, eds. **Quality assurance in Agricultural Produce**. ACIAR PROC, Australia.

Tseng, T.C. and D.F. Bateman. 1968. Production of phosphatidases by phytopathogens. **Phytopathology** 58: 1437-1438.

Valdivia, E. 2000. A Fruit for the deligent. **The Fruits** 32 (1): 12-13.

Vawdrey, L.L., K.R.E. Grice and D. Westerhuis. 2008. Field and laboratory evaluations of fungicides for the control of brown spot (*Corynespora cassiicola*) and black spot (*Asperisporium caricae*) of papaya in far north Queensland, Australia. **Australasian Plant Pathology** 37: 552-558.

Vidhyasekaran, P., E.S. Borromeo and T.W. Mew. 1992. *Helminthosporium oryzae* toxin suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 41: 307-315.

Vos, P., R. Horgers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Homes, A. Frijters, J. Pot., J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23: 4407-4414.

Wang, C.L., C.C. Lin. 2005. Fruit rot of pitaya and stem rot of cacti in Taiwan. **Plant Pathology Bulletin (Chinese)** 14: 269-274.

Wheeler, H. 1977. Ultrastructure of penetration by *Helminthosporium maydis*. **Physiological Plant Pathology** 11: 171-178.

______ and D. Gantz. 1979. Extracellular sheaths on hyphae of two species of *Helminthosporium*. **Mycologia** 71: 1127–1135.

Weising, K., H. Nybom., K. Wolff and W. Meyer. 1995. **DNA Fingerprinting in Plants and Fungi**. CRC Press, Queensland.

Well, J.M. and J.M. Harvey. 1970. Combination heat and 2,6-dichloro-4 nitroaniline treatments for control of *Rhizopus* brown rot of peachs, plums and nectarines. **Phytopathology** 60: 116-120.

Wood, R.K.S. 1973. Specificity in plant diseases, pp. 1–16. *In* R.J.W. Byrde, C.V. Cutting, eds. **Fungal Pathogenicity and the Plant's Response**. Academic Press, London.

______. 1967. **Physiological Plant Pathology**. Blackwell Scientific Publisher Ltd, Oxford.

Yoder, O.C. and R.P. Scheffer. 1981. Effects of *Helminthosporinm carbonum* toxin on nitrate uptake and reductlon by corn tissues. **Plant Physiology** 52: 513-517.

Zhang, H., S. Wang, X. Huang, Y. Dong and X. Zheng. 2008. Integrated control of postharvest blue mold decay of pears with hot water treatment and *Rhodotorula glutinis*. **Postharvest Biology and Technology** 49: 308-313.

Zhang, Z., W. Jiang, Q. Jian, W. Song, Z. Zheng, D. Wanga and X. Liu. 2015. Residues and dissipation kinetics of triazole fungicides difenoconazole and propiconazole in wheat and soil in Chinese fields. **Food Chemistry** 168: 396-403.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ภาคผนวก ก

1. สูตรอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา

1) potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่งสด	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

2. สูตรการเตรียมสารของวิธีการตัดเนื้อเยื่อพืชด้วยเทคนิคพาราฟิน

1) สูตรการเตรียมสาร Formalin-Acetic acid-Alcohol (FAA) 100 ml.

Ethyl alcohol 50%	90	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	5	มิลลิลิตร
Commercial formaline (40% formaldehyde)	5	มิลลิลิตร

2) สูตรการเตรียมสาร series consists of series alcohol 100 ml.

- 50: น้ำ 50 มิลลิลิตร + 95% ethyl alcohol 40 มิลลิลิตร + TBA* 10 มิลลิลิตร
- 70: น้ำ 30 มิลลิลิตร + 95% ethyl alcohol 50 มิลลิลิตร + TBA 20 มิลลิลิตร
- 85: น้ำ 15 มิลลิลิตร + 95% ethyl alcohol 50 มิลลิลิตร + TBA 35 มิลลิลิตร
- 95: 95% ethyl alcohol 45 มิลลิลิตร + TBA 55 มิลลิลิตร
- 100: absolute alcohol 25 มิลลิลิตร + TBA 75 มิลลิลิตร
- TBA: TBA 100 มิลลิลิตร

* TBA = Tertiary Butyl Alcohol อาจใช้ Butyl Alcohol หรือ N- Butyl Alcohol

3) สูตรน้ำยาล้างเครื่องแก้ว

โปแตสเซียมไดโครเมท	100	กรัม
กรดกำมะถันเข้มข้น	500	มิลลิกรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

4) สูตรการเตรียมสาร Haupt’s adhesive

1. ละลาย gelatin 1 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 90 องศาเซลเซียส

2. ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติม glycerin 15 มิลลิลิตร
3. กรองสารละลายโดยใช้กระดาษกรอง เพื่อให้สาร Haupt's adhesive สะอาด
4. เก็บไว้ในตู้เย็น (ช่องธรรมดา)

5) สูตรการเตรียมสีย้อมเนื้อเยื่อพืชเพื่อตรวจดู conidia ของเชื้อรา *B. cactivora*

- xylene : absolute ethyl alcohol อัตราส่วน 1:1
- Series of ethyl alcohol : absolute 95% 70% และ 50%
- Stock solution of safranin : safranin 1 กรัม ละลายใน 95% ethyl alcohol 100 มิลลิลิตร(ก่อนใช้ต้องผสมกับน้ำอัตราส่วน 1:1)
- Counterstain with fast green 0.5 กรัม + clove oil 50 มิลลิลิตร + 95% ethyl alcohol 50 มิลลิลิตร
- Differentiate the fast green : clove oil 50 มิลลิลิตร + absolute ethyl alcohol 25 มิลลิลิตร + xylene 25 มิลลิลิตร

6) วิธีการย้อมสี

1. แช่สไลด์ลงใน xylene นาน 5 นาที
2. แช่สไลด์ลงใน xylene : alcohol ในอัตราส่วน 1:1 นาน 5 นาที
3. แช่สไลด์ลงใน alcohol series อย่างละ 5 นาที (absolute 95% 70% 50%)
4. แช่สไลด์ลงใน safranin นาน 1-24 ชั่วโมง
5. แช่สไลด์ด้วยน้ำสะอาด
6. จุ่มสไลด์แบบผ่านใน ethyl alcohol 70% ที่เติมกรด lactic เล็กน้อย ethyl alcohol 95% absolute ethyl alcohol อย่างรวดเร็ว
7. แช่สไลด์ลงใน fast green 30 วินาที
8. แช่สไลด์ลงใน differentiate the fast green 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. แช่สไลด์ลงใน xylene 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
10. ทำสไลด์ถาวร โดยเมื่อเอาสไลด์ออกจาก xylene แล้วอย่าปล่อยให้สไลด์แห้ง ให้หยด permout ลงบนริมสไลด์ แล้วค่อยๆ วาง cover slide อย่าให้เกิดฟองอากาศ

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลความแปรปรวนทางสถิติ

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ ข1 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของระยะเวลาการงอก germ tube ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	7	706.375	100.911	8.246*
Error	32	391.600	12.237	
Total	39	1097.975		

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข2 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของระยะเวลาการสร้าง appressorium ของเชื้อรา *B. cactivora* บนผลแก้วมังกร

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	7	9301.575	1328.796	26.838*
Error	32	1584.400	49.512	
Total	39	10885.975		

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข3 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการงอก germ tube ภายหลังการจุ่ม conidia เชื้อรา *B. cactivora* ในอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาทีตามลำดับ

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	11	72913.000	6628.455	174.945*
Error	36	1364.000	37.889	
Total	47	74277.000		

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข4 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งการงอก germ tube ภายหลังการจุ่ม conidia เชื้อรา *B. cactivora* ในอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 และ 5 นาทีตามลำดับ

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	8	44920.677	5615.085	89.718*
Error	27	1689.818	62.586	
Total	35	46610.495		

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข5 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการยับยั้งโรคผลเน่าแก้วมังกร ที่เกิดจากเชื้อรา *B. cactivora* ภายหลังการจุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 51 53 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	22183.831	7394.610	13.026*
Error	44	24978.259	567.688	
Total	47	47162.090		

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข6 วิเคราะห์ความแปรปรวน (t-test) การเกิดโรคของโรคผลเน่าของแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Source of Variation	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	F
Treatment	4	65	5.7	2.8	1.5*
Error	4	47.5	9.5	4.7	

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข7 วิเคราะห์ความแปรปรวน (t-test) ความรุนแรงของโรคผลเน่าของแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Source of Variation	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	F
Treatment	4	95.4	5.4	2.7	4.7*
Error	3	84.5	13.5	7.8	

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ ข8 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการเกิดโรคบนผลแก้วมังกร ที่จุ่มด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 53°C เป็นเวลา 1 นาที สารเคมี difenoconazole 37.5 ppm เป็นเวลา 3 นาที และสารเคมี difenoconazole 37.5 ppm ร่วมกับน้ำร้อนอุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

Source of Variation	df	SS	MS	F
Treatment	3	310.750	103.583	113.000*
Error	12	11.000	0.917	
Total	15	321.750		

หมายเหตุ * = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวอารยา ไชยดี
เกิดวันที่	5 มีนาคม 2532
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. เกษตรศาสตร์ (โรคพืช) มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษาจาก คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) (พ.ศ. 2557)