

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเห็ดสร้างแหสายพันธุ์ไทย (*Phallus atrovolvatus*) ด้วยการประยุกต์ใช้
ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า

Enhancement of Thai Strain Bamboo Mushroom (*Phallus atrovolvatus*) Production Through
the Utilization of The Biochar Derived from Spent Mushroom Substrate

วราพร ไชยมา^{1*} อนุสรณ์ วัฒนกุล¹ จิตรา กิตติโมรากุล¹ และ ภาณี สว่างศรี¹
Chaiyama, V.^{1*}, Wattanakul, A.¹, Kittimorakul, J.¹ and Sawangsri, P.¹

¹สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร จังหวัดกรุงเทพฯ 10900

¹Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

*Corresponding author: varaporn18@gmail.com

บทคัดย่อ

เห็ดสร้างแหสายพันธุ์ไทย (*Phallus atrovolvatus*) จัดเป็นเห็ดที่มีสรรพคุณทางยาสูงและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ในขั้นตอนการผลิตเชื้อขยายและการผลิตดอกยังพบปัญหา เช่น เส้นใยเจริญช้า อัตราการปนเปื้อนสูง ผลผลิตต่ำและไม่ได้คุณภาพ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเห็ดสร้างแหสายพันธุ์ DOA-Ph1 ด้วยการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า (DOA -Mushchar) โดยเริ่มจากพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 1 ผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตรข้าวฟ่าง + DOA - Mushchar 0.4 % เชื้อเห็ดเจริญได้เร็วกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ โดยเส้นใยเห็ดเจริญเต็มขวดภายใน 10.17 วัน และผลการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 2 พบว่าเชื้อเห็ดสร้างแหในอาหารสูตรซีเลื้อย+รำ+DOA - Mushchar 4% เจริญได้ดีมีอัตราการเจริญเฉลี่ย 17.56 มิลลิเมตรต่อวัน ส่วนผลในการผลิตดอกเห็ดสร้างแหพบในสูตรอาหารฟางข้าว+ DOA - Mushchar 5% ให้ผลผลิตสูงถึง 2,598.75 กรัม/ตะกร้า (B.E.(%) =12.98) การศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้ DOA - Mushchar สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาสูตรอาหารในกระบวนการผลิตเห็ดสร้างแหสายพันธุ์ไทยเพื่อเพิ่มปริมาณ และลดระยะเวลาการผลิต อีกทั้งยังเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดอีกด้วย

คำสำคัญ : *Phallus atrovolvatus*, ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า, เชื้อขยายขั้นที่ 1

Abstract

The Thai Strain Bamboo mushroom (*Phallus atrovolvatus*) is highly medicinal and economically beneficial. Sluggish mycelium growth, low productivity, and poor quality continue to affect production. This study uses biochar derived from spent mushroom substrates (DOA-Mushchar) to improve mushroom production technique for *Phallus atrovolvatus* DOA-Ph1. For the master spawn experiment, sorghum + DOA-Mushchar 0.4% produced the highest mycelial growth. Mycelium covered the spawn substrate in 10.17 days. Regarding mother spawn output, the average mycelial growth rate was 17.56 per day when using the sawdust + bran + DOA - Mushchar 4% combination. The rice straw + DOA-Mushchar 5% mixture yielded the highest reticulated mushrooms, 2,598.75 g/basket (B.E.(%)=12.98). Our investigation found that DOA-Mushchar exhibits significant

potential to induce mushroom quantity and reduce the production time of Thai Strain Bamboo mushroom. Furthermore, agricultural waste is utilized to achieve optimal efficiency.

Keywords: *Phallus atrovolvatus*, Biochar derived from spent mushroom substrates, Master spawn

บทนำ

เห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย (*Phallus atrovolvatus*) จัดเป็นเห็ดที่มีสรรพคุณทางยาสูงและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกใหม่ในการผลิตเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย ปัจจุบันได้รับความนิยมมากขึ้นในอุตสาหกรรมการผลิตเห็ดของไทย มีรายงานพบว่าสารสกัดจากเห็ดร่างแหมีฤทธิ์ปรับสมดุลภูมิคุ้มกัน โดยจากรายงานของ Chaiyama *et al.* (2020a) พบว่าสามารถลดการอักเสบ ต้านการอักเสบ และบรรเทาความรุนแรงโรคลำไส้อักเสบในหนูทดลองได้ อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง และต่อต้านการเกิดเนื้องอกอีกด้วย (Wasser, 2002) ข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ยา และการแพทย์ต่อไป แต่ในขั้นตอนการผลิตเชื้อขยายและการผลิตดอกยังพบปัญหา เช่น เส้นใยเจริญช้า อัตราการปนเปื้อนสูง ผลผลิตต่ำและไม่ได้คุณภาพ และการผลิตดอกจากเดิมที่มีส่วนประกอบหลายอย่าง ได้แก่ ขี้เลื่อย รำ ปูนขาว ดิกลีอ ยิปซั่ม ทำให้ยุ่งยากต่อการเตรียมการผลิตและมีต้นทุนสูง (วราพร และคณะ, 2557) การนำก้อนเชื้อเห็ดเก่าซึ่งเป็นเศษวัสดุเหลือทิ้ง (waste) หลังการเพาะเห็ดมาเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตไบโอชาร์ (DOA - Mushchar) และนำกลับมาใช้เป็นสารปรับปรุงในสูตรอาหารสำหรับเพาะเห็ดปรับปรุงการผลิตเห็ดร่างแหด้วยเทคโนโลยีสมัยใหม่ ซึ่งคุณสมบัติของ DOA-Mushchar จะสามารถเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโครงสร้างของวัสดุเพาะเห็ด เช่น เพิ่มความจุในการอุ้มน้ำ และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสม ช่วยส่งเสริมและลดระยะเวลาการเจริญของเส้นใยในวัสดุเพาะส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณผลผลิตเห็ด การศึกษารังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ DOA - Mushchar เป็นส่วนผสมในการผลิตเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย *P. atrovolvatus* สายพันธุ์ DOA-Ph1 ช่วยให้การผลิตเห็ดปลอดภัยมีประสิทธิภาพสูง ทำให้เกิดมูลค่าทางเศรษฐกิจด้วยการเพาะเห็ด ซึ่งเป็นแนวทางในการประกอบอาชีพเกษตรกรรมที่มีความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืน มีรายได้เพิ่มขึ้น ชุมชนมีความเข้มแข็ง มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1) และการเตรียมไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า

การเตรียมแม่เชื้อเห็ด โดยนำเชื้อเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย *P. atrovolvatus* สายพันธุ์ DOA-Ph1 เป็นสายพันธุ์บริการของกรมวิชาการเกษตร (เห็ดร่างแห-1) ย้ายเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 วัน แล้วจึงนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การเตรียมไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า นำก้อนเชื้อเห็ดเก่าซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเห็ด โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ก้อนเชื้อเก่าจากเห็ดนางรมภูฐาน เนื่องจากเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่เกษตรกรนิยมเพาะมากที่สุด ก่อให้เกิดวัสดุเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก จากนั้นนำมาคัดเลือกก้อนที่ยังไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นำถุงพลาสติกออก แบ่งก้อนเห็ดเป็น 4 – 6 ชั้น นำมาตากให้แห้งในพื้นที่ถ่ายเทสะดวก จากนั้นนำมาเข้าสู่กระบวนการผลิตไบโอชาร์ด้วยเทคนิค Pyrolysis โดยใช้เตาเผาแบบเตาเบ็บซี (BEBC Stove) ซึ่งเป็นเตาพลังงานชีวมวลผลิตแก๊สหุงต้มและไบโอชาร์ระดับครัวเรือน ขนาดบรรจุ 50 ลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตจะได้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรมให้ชื่อว่า DOA - Mushchar นำไบโอชาร์มาบดด้วยเครื่องบดแห้งอนุภาคให้เป็นผงละเอียด แล้วจึงนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การศึกษาผลของ DOA - Mushchar ในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 1 (Master spawn) ของเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD, completely randomized design) ทำการทดลอง 5 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ขวด ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1) ข้าวฟ่าง 100 เปอร์เซ็นต์ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ) กรรมวิธีที่ 2) ข้าวฟ่าง + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 0.1 โดยน้ำหนัก) กรรมวิธีที่ 3) ข้าวฟ่าง + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 0.2 โดยน้ำหนัก) กรรมวิธีที่ 4) ข้าวฟ่าง + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 0.3 โดยน้ำหนัก) และกรรมวิธีที่ 5) ข้าวฟ่าง + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 0.4 โดยน้ำหนัก)

เตรียมเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุก แล้วนำไปผสมกับ DOA - Mushchar ในอัตราส่วนตามกรรมวิธีต่าง ๆ บรรจุลงขวดแก้วปริมาณ 150 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อหนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยให้เย็น จากนั้น ทำการใส่แม่เชื้อวุ้นเห็ดร่างแหสายพันธุ์ DOA-Ph1 แล้วนำไปบ่มเลี้ยงเส้นใยในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (30±2 องศาเซลเซียส) หลังจาก ปลูกเชื้อนาน 7 วัน จึงทำการทำการบันทึกข้อมูล 1) อัตราการเจริญ/จำนวนวันที่เจริญเต็มขวด 2) อัตราการปนเปื้อน และ 3) ประเมินความหนาแน่นของเส้นใยโดยแบ่งเป็น 3 ระดับคือ เส้นใยเห็ดร่างแหเจริญอย่างสม่ำเสมอและคลุมวัสดุทดสอบมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แทนด้วยสัญลักษณ์ (+++) เส้นใยเจริญคลุมวัสดุทดสอบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แทนด้วยสัญลักษณ์ (++) และเส้นใยเจริญคลุมวัสดุทดสอบมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ แทนด้วยสัญลักษณ์ (+)

3. การศึกษาผลของ DOA - Mushchar ในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 2 (Mother spawn) ของเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (โดยทำการทดลองในถุงพลาสติก วัสดุที่ใช้ผลิตเชื้อขยายมี 6 สูตร (กรรมวิธี) แต่ละสูตรมี 50 ถุง ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ สูตรที่ 1) ซีลี้อย + รำ + ปูนขาว + ดิเกลื้อ + ยิปซัม (อัตราส่วน 90 : 5 : 1 : 2 : 2 โดยน้ำหนัก) (วราพร และคณะ, 2557) สูตรที่ 2) ซีลี้อย + น้ำตาล + ยิปซัม (อัตราส่วน 98 : 1 : 1 โดยน้ำหนัก) (วราพร และคณะ, 2558) สูตรที่ 3) ซีลี้อย + รำ + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 2 : 1 โดยน้ำหนัก) สูตรที่ 4) ซีลี้อย + รำ + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 2 : 2 โดยน้ำหนัก) สูตรที่ 5) ซีลี้อย + รำ + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 2 : 3 โดยน้ำหนัก) และสูตรที่ 6) ซีลี้อย + รำ + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 2 : 4 โดยน้ำหนัก) นำวัสดุแต่ละสูตรผสมให้เข้ากัน เติมน้ำทำให้มีความชื้นประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 7 x 12 นิ้ว ถุงละ 300 กรัม อัดวัสดุให้แน่นพอสมควร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแบบปล่อยความดันไอที่อุณหภูมิ 90 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งก้อนเห็ดไว้ให้เย็นจึงใส่เชื้อขยายขั้นที่ 1 ที่เลี้ยงไว้ในเมล็ดข้าวฟ่าง ลงไป 10-15 เมล็ดต่อถุง บ่มเลี้ยงที่ช่วงอุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด หลังจากปลูกเชื้อได้ 7 วัน จึงเปรียบเทียบระยะเวลาที่เชื้อเห็ดเจริญเต็มก้อน โดยทำการวัดอัตราการเจริญ/จำนวนวันที่เส้นใยเจริญเต็มถุง อัตราการปนเปื้อน และ ประเมินความหนาแน่น ของเส้นใย โดยแบ่งเป็น 3 ระดับคือ เส้นใยเห็ดร่างแหเจริญอย่างสม่ำเสมอและคลุมวัสดุทดสอบมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แทนด้วยสัญลักษณ์ (+++) เส้นใยเจริญคลุมวัสดุทดสอบมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แทนด้วยสัญลักษณ์ (++) และเส้นใยเจริญคลุมวัสดุทดสอบมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ แทนด้วยสัญลักษณ์ (+)

4. การศึกษาผลของ DOA - Mushchar ต่อเกิดดอกเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1) บนวัสดุเพาะ

การศึกษานี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกหรือบล็อกสมบูรณ์ (RCBD) โดยทำการทดลองวัสดุเพาะมี 4 สูตร (กรรมวิธี) แต่ละสูตรมี 5 ตะกร้า (ซ้ำ) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ 1) ฟางข้าว 100 เปอร์เซ็นต์ 2) ฟางข้าว + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 1 โดยน้ำหนัก) 3) ฟางข้าว + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 2.5 โดยน้ำหนัก) และ 4) ฟางข้าว + DOA - Mushchar (อัตราส่วน 100 : 5 โดยน้ำหนัก) จากนั้นนำฟางข้าวหมักกับน้ำเปล่า 1 คิน นำฟางข้าวหมักผสมตามสูตรของแต่ละกรรมวิธีให้เข้ากันโดยให้ความชื้น 65 เปอร์เซ็นต์นำวัสดุที่หมักแล้วใส่ในตะกร้าพลาสติกปริมาณ 5 กิโลกรัม ให้สูงประมาณ 20 เซนติเมตร อัดให้แน่นพอสมควร ใส่เชื้อขยายเห็ดร่างแห โดยเจาะเป็นหลุมเล็กๆ ใส่ก้อนเชื้อขนาดเท่าหัวแม่มือ กระจายให้ทั่ว เมื่อเส้นใยเดินเต็มผิวหน้าวัสดุเพาะจึงโรยทับด้วยดินขุยไผ่หนาประมาณ 2-3 เซนติเมตร รดน้ำตามพุ่ม และความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ รอจนกระทั่งเห็ดออกดอก ทำการบันทึก

ข้อมูล 1) อัตราการเจริญ/จำนวนวันที่เจริญเต็มวัสดุเพาะ 2) ประเมินอัตราการปนเปื้อน 3) น้ำหนักสดผลผลิต และ 4) เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเฉลี่ยต่อน้ำหนักวัสดุแห้ง โดยใช้สูตร

$$\text{Beneficial efficiency (B.E. (\%))} = \frac{\text{น้ำหนักเห็ดสดที่ได้รับ}}{\text{น้ำหนักวัสดุแห้งที่ใช้เพาะ}} \times 100$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของ DOA - Mushchar ในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 1 ของเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1)

การทดสอบระดับความเข้มข้นของ DOA - Mushchar ในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 1 ของเห็ดร่างแหสายพันธุ์ DOA-Ph1 ผลการศึกษาพบว่าเชื้อเห็ดร่างแหในกรรมวิธีที่ 5 (ข้าวฟ่าง + DOA - Mushchar อัตราส่วน 1 : 0.4 โดยน้ำหนัก) และกรรมวิธีที่ 4 (ข้าวฟ่าง+ DOA - Mushchar อัตราส่วน 1 : 0.3 โดยน้ำหนัก) เจริญได้ดีเร็วกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ โดยเส้นใยเห็ดเจริญเต็มขวดภายใน 10.17 และ 10.25 วัน ตามลำดับ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3 และ 2 เส้นใยเห็ดเจริญเต็มขวดใช้เวลาเฉลี่ย 13.92 และ 15.42 วัน ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ 1 (ข้าวฟ่าง 100 เปอร์เซ็นต์) เส้นใยเห็ดเจริญได้ช้าที่สุด คือ 17.58 วัน และการประเมินอัตราการเจริญของเส้นใย (mycelia growth rate) พบว่า ในกรรมวิธีที่ 5 และ 4 มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยเป็น 10.82 และ 10.73 มิลลิเมตรต่อวัน ส่วนในกรรมวิธีที่ 3, 2 และ 1 มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยเป็น 7.90, 7.14 และ 6.26 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ (Table1, Figure 1) และการประเมินความหนาแน่นของเส้นใย พบว่ากรรมวิธีที่ 4 มีระดับความหนาแน่นของเส้นใยอยู่ในระดับดีมาก (+++) ส่วนกรรมวิธีอื่น ๆ มีระดับความหนาแน่นในระดับปานกลาง (++) และการประเมินการปนเปื้อนขณะการบ่มเลี้ยงเส้นใย พบว่า กรรมวิธีที่ 1 (ควบคุม) พบอัตราการปนเปื้อนสูงสุด คือ 3.18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ 2 และ 3 มีอัตราการปนเปื้อน 2.1 และ 1.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีที่ 4 และ 5 ไม่พบการปนเปื้อน (Table1)

Table 1 Incubation periods, mycelial density and percentage contamination of *Phallus atrovolvatus* master spawn, treated with various concentrations of DOA - Mushchar

Treatment	DOA-Mushchar (%)	Incubation Period (Day) ^{1/}	Mycelial Density ^{2/}	Contamination (%)
1. boiled sorghum 100% (Control)	0	17.58 d	++	3.18
2. boiled sorghum + DOA - Mushchar	0.1	15.42 c	++	2.1
3. boiled sorghum + DOA - Mushchar	0.2	13.92 b	++	1.8
4. boiled sorghum + DOA - Mushchar	0.3	10.25 a	+++	None
5. boiled sorghum + DOA - Mushchar	0.4	10.17 a	++	None

^{1/} Means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 5 % level by LSD

^{2/} + denotes the density of the mycelium. More + indicates more dense growth of the mycelium.

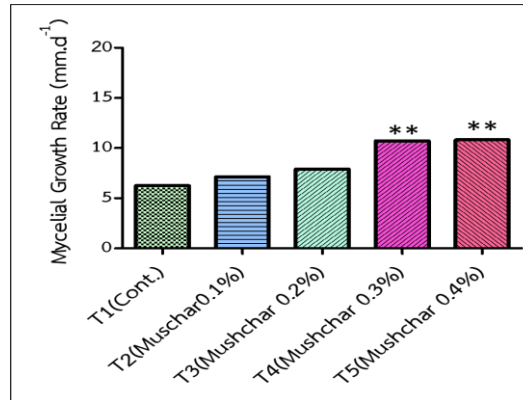


Figure 1 The mycelial growth rate (measured in mm/day) of *Phallus atrovolvatus* strain DOA-Ph1 master spawn, treated with various concentrations of DOA – Mushchar. The asterisk indicates significant difference ($p < 0.01$) compared to the control group.

2. ผลของ DOA - Mushchar ในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 2 ของเห็ดร่างแหสหายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1)

การทดสอบประสิทธิภาพของ DOA - Mushchar ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 2 ของเชื้อเห็ดร่างแหสหายพันธุ์ DOA-Ph1 ผลการศึกษาพบว่าในกรรมวิธีที่ 6 และ 5 (เติม DOA - Mushchar 4 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) เส้นใยเห็ดร่างแหเจริญได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ โดยเส้นใยสามารถเจริญเต็มก่อนใช้เวลาเฉลี่ย 18.05 และ 18.15 วัน ตามลำดับ มีอัตราการเจริญของเส้นใยต่อวันเฉลี่ย 17.56 และ 17.49 มิลลิเมตรต่อวัน ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมทั้งสองกรรมวิธี (สูตรไม่เติม DOA - Mushchar) เส้นใยจากกรรมวิธีควบคุมใช้เวลานานถึง 34.45 วัน เส้นใยจึงเจริญเต็มก่อนวัสดุเพาะ (อัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ย 9.22 มิลลิเมตรต่อวัน) ในขณะที่ในกรรมวิธีที่ 3 และ 4 พบว่าเส้นใยเห็ดร่างแหใช้เวลาเจริญเต็มก่อนชื้อนาน 29.65 และ 25.05 วัน และมีอัตราการเจริญของเส้นใยต่อวันเฉลี่ยเป็น 10.71 และ 12.67 มิลลิเมตรต่อวัน ตามลำดับ (Figure 2) ส่วนการประเมินความหนาแน่นของเส้นใย พบว่าในทุกๆ กรรมวิธี มีระดับความหนาแน่นของเส้นใยอยู่ในระดับดีมาก (+++) และการประเมินการปนเปื้อนขณะการบ่มเลี้ยงเส้นใย พบว่า ในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 (ควบคุม) พบอัตราการปนเปื้อนสูงสุด คือ 1.15 และ 1.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในกรรมวิธีที่ 3 พบอัตราการปนเปื้อนเพียง 0.1 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ 4,5 และ 6 ไม่พบการปนเปื้อน (Table 2)

Table 2 Incubation periods, mycelial density and percentage contamination of *Phallus atrovolvatus* mother spawn, treated with various concentrations of DOA - Mushchar

Treatments	DOA- Mushchar (%)	Incubation Period (Day) ^{1/}	Mycelial Density ^{2/}	Contamination (%)
1. sawdust+ rice bran+ lime+epsom salt+ gypsum	0	34.45 d	+++	1.15
2. sawdust+ sugar+ gypsum	0	29.55 c	+++	1.18
3. sawdust+ rice bran + DOA-Mushchar	1	29.65 c	+++	0.10
4. sawdust+ rice bran + DOA-Mushchar	2	25.05 b	+++	None
5. sawdust+ rice bran + DOA-Mushchar	3	18.15 a	+++	None
6. sawdust+ rice bran + DOA-Mushchar	4	18.05 a	+++	None

^{1/} Means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 5 % level by LSD

^{2/} + denotes the density of the mycelium. More + indicates more dense growth of the mycelium

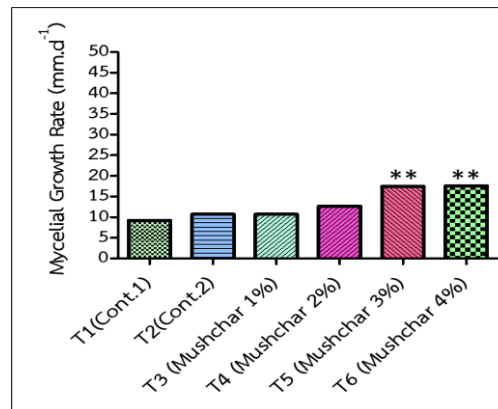


Figure 2 The mycelial growth rate (measured in mm/day) of *Phallus atrovolvatus* strain DOA-Ph1 mother spawn, treated with various concentrations of DOA – Mushchar. The asterisk indicates significant difference ($p < 0.01$) compared to the control group.

การเติม DOA - Mushchar ลงในสูตรผสมของเชื้อขยายขั้นที่ 2 ช่วยให้เส้นใยเห็ดสร้างแหเจริญได้ดีและเร็วกว่าสูตรอาหารที่ไม่มี DOA - Mushchar (ชุดควบคุม) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nam และคณะ (2018) รายงานว่าการเติมไบโอชาร์จากกะลาปาล์ม (20 กรัม) ส่งเสริมให้เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เจริญได้อย่างรวดเร็ว โดยเส้นใยเห็ดเจริญเต็มถุงใช้เวลาเฉลี่ยเพียง 21 วัน ขณะที่กรรมวิธีควบคุมใช้เวลา 35 วัน เส้นใยจึงจะเจริญเต็มก้อน จากคุณสมบัติของไบโอชาร์ที่มีเครือข่ายรูพรุน (porous network) ขนาดเล็กสูงของ DOA - Mushchar จึงทำหน้าที่ช่วยกักเก็บน้ำและดูดซับธาตุอาหารจากรำข้าว และช่วยให้การส่งผ่าน (translocation) ของน้ำและธาตุอาหารผ่านเครือข่ายรูพรุนได้ง่ายขึ้น ช่วยส่งเสริมให้เส้นใยเจริญได้ดี และเร็วยิ่งขึ้น (Zhu *et al.*, 2017) ไบโอชาร์จึงทำหน้าที่เปรียบเสมือนเป็นแหล่งที่อยู่ กักเก็บ และรักษาน้ำ ธาตุอาหารที่ได้จากรำข้าว และขี้เลื่อย ซึ่งเป็นผสมหลักของวัสดุเพาะเชื้อขยายขั้นที่ 2 แต่อย่างไรก็ตาม การเจริญของเส้นใยเห็ดขึ้นอยู่กับปริมาณธาตุอาหาร และน้ำ ที่ได้จากรำข้าว และขี้เลื่อย ดังนั้นหากจะเพาะเลี้ยงด้วยโอชาร์เพียงอย่างเดียว ก็ไม่สามารถช่วยให้เส้นใยเห็ดเจริญเร็วขึ้นได้

3. ผลของ DOA - Muschar ต่อการเกิดดอกเห็ดสร้างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1) บนวัสดุเพาะ

จากการศึกษาผลของ DOA - Muschar ต่อการให้ผลผลิตของเห็ดสร้างแห พบว่าเห็ดสร้างแหสายพันธุ์ไทย (DOA-Ph1) สร้างตุ่มดอกขนาดเล็ก ในเวลา 10-15 วัน และดอกเห็ดใช้เวลาเจริญเติบโตอีกประมาณ 30-35 วัน จนอยู่ในช่วงที่มีลักษณะเหมาะสมต่อการเก็บผลผลิต (Figure 3) ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลผลผลิต พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยเฉพาะในกรรมวิธีที่ 4 (ฟางข้าว : DOA - Muschar อัตราส่วน 100 : 5 โดยน้ำหนัก) พบว่าให้ผลผลิตสูงถึง 2,598.75 กรัมต่อตะกร้า และมีค่า B.E. เท่ากับ 12.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ คิดเป็น 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 3 และ 2 มีผลผลิตดอกเห็ดคือ 2,596.25 และ 2,337.5 กรัมต่อตะกร้า และมีค่า B.E. เท่ากับ 12.75 และ 11.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งไม่มีการเติม DOA - Muschar พบว่าให้ผลผลิตต่ำสุด คือ 1,732.0 มีค่า B.E. เท่ากับ 8.66 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อประเมินอัตราการปนเปื้อน พบว่าในกรรมวิธีที่ 1 (ควบคุม) พบอัตรา การปนเปื้อนสูงสุด คือ 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกรรมวิธีที่ 2, 3 และ 4 มีอัตราการปนเปื้อน 13.33, 6.67 และ 6.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 3) แสดงให้เห็นว่าการเติมไบโอชาร์เป็นการเพิ่มปริมาณธาตุอาหาร และน้ำ ที่มีประโยชน์พร้อมปลดปล่อยส่งผ่านเครือข่ายรูพรุนขนาดเล็กปริมาณมหาศาล ส่งผลให้เห็ดสร้างแหสามารถดูดซับ และนำไปสร้างดอกเห็ดได้อย่างเพียงพอ และคุณสมบัติสำคัญคือ ความสามารถในการอุ้มน้ำ ซึ่งจะช่วยรักษาความชื้นให้เหมาะสมในระยะเวลาการสร้างดอกเห็ด เนื่องจากเห็ดสร้างแหในระยะไข่ (egg stage) เป็นระยะต้องการความชื้นสูง หากขาดน้ำหรือความชื้นไม่เพียงพอ จะส่งผลให้ระยะไข่ เกิดการฝ่อ และเหี่ยวไป จนไม่สามารถเจริญดอกเห็ดที่สมบูรณ์ในที่สุด (Yang *et al.*, 2013) การศึกษาครั้งนี้ แสดง

ให้เห็นว่าการเติม DOA - Mushchar ในวัสดุเพาะเห็ดมีผลต่อการช่วยส่งเสริมการเจริญทั้งเส้นใย และเพิ่มปริมาณผลผลิตเห็ดสร้างแหสาย พันธุ์ DOA-Ph1 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

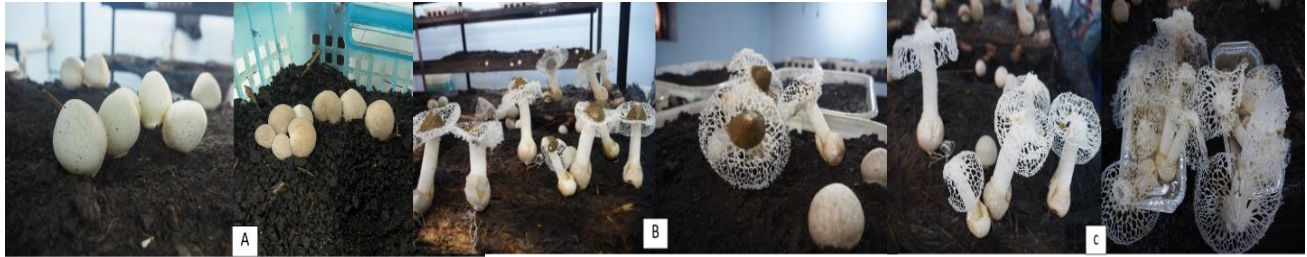


Figure 3 Different stages of *Phallus atrovolvatus* (DOA-Ph1); A) egg stage, B) fruiting body, and C) detached cap of the mature mushroom

Table 3 Yield, beneficial efficiency, and percentage contamination of *Phallus atrovolvatus* sawdust spawn, treated with various concentrations of DOA - Mushchar

Treatments	DOA-Mushchar (%)	Yield (g/basket) ^{1/}	B.E. (%)	Contamination (%)
1. paddy straw 100%	0	1,732.00 c	8.66	20.00
2. paddy straw + DOA-Mushchar	1	2,337.50 b	11.69	13.33
3. paddy straw + DOA-Mushchar	2.5	2,596.25 a	12.75	6.67
4. paddy straw + DOA-Mushchar	5	2,598.75 a	12.98	6.67

^{1/} Means followed by the same letter in the column were not significantly different at the 5 % level by LSD (Least significant difference)

สรุปผล

ศึกษาการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าในการผลิตเห็ดสร้างแหสายพันธุ์ DOA-Ph1 โดยเริ่มจากผสมสูตรอาหารในการผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 1 พบว่าเชื้อเห็ดสร้างแหที่เติม DOA - Mushchar 0.4 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้เร็วกว่ากรรมวิธีอื่นๆ แต่ที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยเห็ดจะมีความหนาแน่นกว่า และเมื่อนำมาใช้ผลิตเชื้อขยายขั้นที่ 2 พบว่าเส้นใยเห็ดสร้างแหที่ผสม DOA-Mushchar 4 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ดีที่สุด และผลจากให้ผลผลิตดอกเห็ดสร้างแห พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลผลิตสูงกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยเฉพาะในกรรมวิธีที่เติม DOA-Mushchar อัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังลดอัตราการปนเปื้อนอีกด้วย

ในขบวนการผลิตเห็ด การจัดการกับวัสดุเหลือทิ้งหลังการเพาะเห็ด (ก้อนเชื้อเห็ดเก่า เศษดอกเห็ด) เป็นปัญหาสะสมมานาน ซึ่งยังไม่มีการจัดการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ การนำวัสดุเหลือทิ้งหลังการเพาะเห็ด มาผลิตเป็นไบโอชาร์และนำไปใช้ไบโอชาร์ที่ได้กลับมาใช้ในการผลิตเห็ด หรือสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไบโอชาร์ที่ใช้กับการเกษตรด้านอื่นๆ เช่น เป็นสารบำรุง/ปรับปรุงดิน จึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางที่มีประสิทธิภาพ ประสิทธิภาพอย่างมาก ที่จะสามารถขยายผลส่งเสริมให้เกษตรกร/ผู้ประกอบการ นำไปพัฒนาต่อยอดต่อไป การปรับปรุงพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมกับการผลิตเห็ดแต่ละชนิด ยังเป็นเรื่องหลักที่ควรให้ความสำคัญในกระบวนการผลิตเห็ดให้ได้คุณภาพ ตรงกับความต้องการของตลาด และผู้บริโภค อีกทั้งยังต้องคำนึง ต้นทุนการผลิตให้ส่งผลให้ได้

ผลตอบแทน ที่คุ้มทุน คุ้มค่ามากที่สุด การนำหลักการ zero waste มาใช้ในระบบการผลิตเห็นได้ว่าเป็นรูปธรรม สามารถขยายผล การศึกษาในเห็นชนิดอื่นๆ ได้โดยมีกรรมวิธีการทดลองเช่นเดียวกัน

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) สำหรับแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัยใน โครงการพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตให้ตรางแหสายพันธุ์ไทยและเห็ดหลินจือด้วยการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า

เอกสารอ้างอิง

- วราพร ไชยมา, อนุสรณ์ วัฒนกุล และกรกช จันทร. 2557. ศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเห็ดตรางแหในภาคกลาง. ใน รายงานผลงานวิจัย และพัฒนา สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 67-103.
- Chaiyama, V., Keawsompong, S., LeBlanc, J.G., de LeBlanc, A.D.M., Chatel, J.M. and Chanput, W., 2020 a. Action modes of the immune modulating activities of crude mushroom polysaccharide from *Phallus atrovolvatus*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 23, p.100216.
- Chaiyama, V., Mau, J.L. and Keawsompong, S., 2020 b. Morphological characteristics, molecular identification and antioxidant activities of *Phallus atrovolvatus* (Agaricomycetes) isolated from Thailand. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(8).
- Nam, W.L., Su, M.H., Phang, X.Y., Chong, M.Y., Liew, R.K., Ma, N.L. and Lam, S.S. 2018. Production of bio-fertilizer from microwave vacuum pyrolysis of palm kernel shell for cultivation of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Science of The Total Environment* 624: 9-16.
- Yang, W., Guo, F., & Wan, Z. (2013). Yield and size of oyster mushroom grown on rice/wheat straw basal substrate supplemented with cotton seed hull. *Saudi journal of biological sciences*, 20(4), 333-338.
- Wasser, S. J. A. M. B. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*, 60, 258-274.
- Zhu, X., Chen, B., Zhu, L., & Xing, B. (2017). Effects and mechanisms of biochar-microbe interactions in soil improvement and pollution remediation: a review. *Environmental pollution*, 227, 98-115.

การใช้เทคนิคแลมป์เพื่อการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาเหตุโรคใบขาวในอ้อย

Using LAMP Technique for Detection Phytoplasma Causing White Leaf Disease in Sugarcane

วีรกรณ์ แสงไสย์^{1*} เบลญวรรณ รัตวัตร์¹ Youichi Kobori² และ ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล¹
Saengsai W. ^{1*}, Ruttawat B. ¹, Youichi K. ² and Sakuanrungsirikul S. ¹

¹ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000

¹Khon Kaen Field Crops Research Center, Sila, Mueang Khon Kaen, Khon Kaen, 40000.

²Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan

* Corresponding author: weerakorn.saengsai@gmail.com

บทคัดย่อ

โรคใบขาวจัดเป็นโรคอ้อยที่สำคัญที่สร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอ้อยของไทย การแพร่กระจายของโรคที่ส่งผลกระทบมากที่สุด และสามารถถ่ายทอดไปกับท่อนพันธุ์ ปัจจุบันการตรวจคัดกรองโรคมีความยุ่งยากซับซ้อน ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง ทำให้การตรวจโรคไม่แพร่หลาย การควบคุมโรคจึงขาดประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจแบบใหม่ด้วยเทคนิค LAMP ที่ใช้งานง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายต่ำกว่า ดำเนินการโดยออกแบบไพรเมอร์จากยีน *Imp* ของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว จำนวน 3 คู่ ใช้เครื่อง Thermostatic colorimeter และน้ำยาสำเร็จรูปในการทดลอง ผลการทดลองพบว่า วิธี LAMP มีความไวสูงสามารถตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาได้ต่ำถึง 1.58×10^{-1} copy/ μ l เทียบเท่ากับการตรวจด้วยวิธี nested-PCR ที่ใช้ในการทดลองนี้ ไพรเมอร์ที่ได้มีถูกต้อง แม่นยำ และจำเพาะต่อเชื้อในอ้อยโดยสามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว แต่ไม่สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างจากหญ้าและมันสำปะหลังได้ การตรวจสอบด้วยเทคนิค LAMP ใช้เวลาทั้งหมด 60 นาที ในขณะที่วิธี nested-PCR ใช้เวลาประมาณ 2 วัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการ LAMP ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความรวดเร็ว และง่ายในการใช้งาน สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคไฟโตพลาสมาในอ้อยก่อนการขยายพันธุ์หรือคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โรคใบขาว อ้อย การขยายพันธุ์อ้อย เทคนิคแลมป์

Abstract

Sugarcane white leaf (SCWL) disease is the most important diseases that impact great lost in sugarcane industries in Thailand. a major disease transmitted through cuttings, poses a significant threat to sugarcane crops. The most damaging route is through propagation of the infected seed canes by the farmers. The highly sensitive detection techniques of the infected seed canes are available but the applications are not widespread because of the technical complications and high cost. Disease prevention and control are thus less effective. This research presented a new simple, rapid and less expensive method based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system. A set of three primer pairs was designed based on SCWL phytoplasma *Imp* gene. The result revealed that the LAMP system was as sensitive as those produced by the nested-PCR tested set. The lowest detectable concentration of phytoplasma was equivalence to 1.58×10^{-1} copy/ μ l. The LAMP primers showed the accuracy and specificity in detection of sugarcane white leaf phytoplasma and non-detectable of the phytoplasmas in grass and cassava. Detection the phytoplasma using LAMP technique was completed within 60 minutes. It is concluded here that this LAMP method provides a

simpler, faster and sensitive mean for the detection of phytoplasmas associated the sugarcane diseases. This method can be used as an effective detection technique for the mass screening of the sugarcane prior to propagation or selection for the healthy mother plant plots in the field.

Keywords: White leaf disease, Sugarcane, Sugarcane propagation, LAMP technique.

บทนำ

โรคสำคัญที่ส่งผลเสียหายอย่างมากต่อการผลิตอ้อยในไทยและประเทศเพื่อนบ้านได้แก่ โรคใบขาว (sugarcane white leaf: SCWL) โรคใบขาวร่วมกับอาการกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) และโรคกอตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGGs) โรคทั้งสามชนิดนี้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่างกัน จากการจัดแบ่งกลุ่มโดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสภายในยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดต่างๆ (IRPCM, 2004) พบว่าเชื้อ SCGS และ SCWL ถูกจัดอยู่ภายในกลุ่ม 16SrXI-B เชื้อสองชนิดนี้มีความใกล้เคียงกัน และมีอาการร่วมกันคือทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวต่างกันที่การแสดงอาการแตกกอฝอย ส่วนอ้อยที่ติดเชื้อ SCGGs นั้นจะไม่แสดงอาการใบขาว แต่แตกกอเขียวคล้ายกอตะไคร้ เชื้อนี้มีความแตกต่างจากสองเชื้อแรกและแยกกลุ่มออกมาอย่างชัดเจน แต่ยังไม่พบการรายงานจัดกลุ่ม (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ, 2555; Abeyasinghe *et al.*, 2016; Zhang, *et al.*, 2016, Rao *et al.*, 2012, Marcone, 2002). มีรายงานว่า SCWL และ SCGS มีเชื้อยีสต์สองชนิด คือ *Matsumuratettix hiroglyphicus* และ *Yamatotettix flavovitatus* เป็นพาหะ (Hanboonsong *et al.*, 2006) แต่ SCGGs ยังไม่มีรายงานการศึกษา อย่างไรก็ตามความเสียหายเกิดจากเกษตรกรนำท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อไปปลูกขยายต่อ จากรายงานพบว่าการแสดงอาการของโรคขึ้นกับปัจจัยหลักสามชนิด คือ ปริมาณเชื้อภายในต้น ความแข็งแรงของพืช และสภาพภูมิอากาศ (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ, 2558) ในประเทศไทยโรค SCWL และ SCGS จะแสดงชัดเจนในสภาพดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มดินทราย และจะพบเห็นอาการเด่นชัดหลังสภาวะแล้งยาวนานแล้วตามด้วยฝนตกซึ่งเกิดน้ำท่วมขัง (กอบเกียรติ ไทศาลเจริญ และคณะ, 2554) การตรวจคัดกรองโรคใช้เทคนิค nested-PCR ที่มี 16S rRNA เป็นยีนเป้าหมาย โดยเจาะจงที่บริเวณ 16S-23S ITS (Hanboonsong, *et al.*, 2002; 2006) ซึ่งพบว่าวิธีการนี้มีความไวสูง สามารถตรวจจับเชื้อในปริมาณที่ต่ำกว่า 1 copy/ μ l ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัมได้ แต่วิธีการนี้ใช้ระยะเวลา 2-3 วัน ในการตรวจเนื่องจากต้องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สองชุด อีกทั้งมีความเสี่ยงสูงในการเกิดการปนเปื้อนได้ผลปลอม ส่วนวิธีการตรวจโดยใช้ยีนเป้าหมายในบริเวณยีน *secA* ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ทั่วไปและมีความไวที่ต่ำกว่ามาก (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ, 2556; 2558) การตรวจด้วยวิธี quantitative realtime PCR (qPCR) เป็นวิธีที่เร็วและมีประสิทธิภาพมากกว่า แต่พบว่าปริมาณต่ำสุดที่อยู่ในช่วงที่ยอมรับได้นั้นจะมีค่าประมาณ 10^2 copy/ μ l ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ซึ่งน้อยกว่า nested-PCR นอกจากนี้เนื่องจากเครื่องมีความไวต่อการตรวจจับสัญญาณการเรืองแสง ความคลาดเคลื่อนในสัดส่วนของปฏิกิริยาที่ใช้จึงมีผลต่อค่าที่อ่านได้อย่างมาก ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานที่ต้องใช้เครื่องมือชนิดนี้ต้องมีความชำนาญสูง ซึ่งเป็นปัญหาอย่างมากในการใช้งานอุปกรณ์ดังกล่าว อีกทั้งเครื่องมือดังกล่าวนี้ยังมีราคาสูง จากความยุ่งยาก ซับซ้อน ของวิธีการที่ใช้พื้นฐานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ค่าใช้จ่ายที่รวมถึงเครื่องมือ อุปกรณ์ในการจัดตั้งห้องปฏิบัติการ ทำให้หน่วยตรวจคัดกรองมีจำนวนจำกัด นอกจากนี้การตรวจคัดกรองท่อนพันธุ์ไม่เป็นที่แพร่หลายเนื่องจากค่าวิเคราะห์ต่อตัวอย่างมีราคาสูง ซึ่งประมาณ 300 ถึง 500 บาท หรือมากกว่า ทำให้การตรวจคัดกรองโรคไม่ได้ผล และไม่ทันการณ์ ส่งผลให้การควบคุมโรคขาดประสิทธิภาพ ยังพบการแพร่ระบาดของโรคอย่างรุนแรงทุกปี และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตอ้อยของไทยสูงกว่าประเทศคู่แข่ง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจโรคที่มีประสิทธิภาพ มีความไวสูง มีต้นทุนทั้งในการจัดตั้งหน่วยตรวจ และค่าใช้จ่ายในการตรวจต่ำ ใช้งานง่าย และให้ผลในระยะเวลาที่รวดเร็ว จึงเป็นวิธีการที่ควรจะนำมาใช้ในการจัดการควบคุมโรค ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการใหม่ๆ หลายวิธีที่มีประสิทธิภาพดังกล่าว Loop mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในอุณหภูมิเดียวต่างจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ต้องใช้อุณหภูมิ 3 ระดับ จึงทำให้เครื่องมือในการตรวจวัดปฏิกิริยา LAMP มีราคาที่ถูกกว่ามาก รวมทั้งใช้การเรืองแสงหรือใช้ความขุ่นเป็นสัญญาณบ่งบอกการเกิดปฏิกิริยา ทำให้สามารถตรวจผลได้ด้วยตาเปล่าโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือในการตรวจผล นอกจากนี้ยังใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้มีการออกแบบให้สามารถตรวจจับและเพิ่มปริมาณตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายได้ไม่ต่ำกว่า 3 ตำแหน่งในเวลาเดียวกัน ทำให้ผลผลิตของปฏิกิริยามีปริมาณมากกว่าวิธีพีซีอาร์เป็นร้อยเท่า จึงทำ

ให้เห็นผลได้รวดเร็วกว่า และมีความไวที่มากกว่าวิธีพีซีอาร์ทั่วไปที่ใช้ปฏิกิริยาหนึ่งชุด (Tomlinson *et al.*, 2010, Nagamine *et al.*, 2002, Natomi *et al.*, 2000) ในปัจจุบันมีน้ำยาสำเร็จรูปสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP จำหน่ายอย่างกว้างขวาง และมีราคาที่ย่อมเยาประมาณ 120-200 บาทต่อตัวอย่าง จึงทำให้มีการนำวิธีการนี้มาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจโรคหลายชนิด มีรายงานการใช้เทคนิค LAMP ชนิดครอบคลุมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา *Candidatus Phytoplasma asteris* อย่างได้ผล โดยตรวจจับที่ housekeeping gene (Sugawara *et al.*, 2012, Mitrovic *et al.*, 2011) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิค LAMP สำหรับการตรวจคัดกรองโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ชุดน้ำยา LAMP สำเร็จรูป และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการที่ได้กับการตรวจด้วยเทคนิค Nested-PCR ที่มีการใช้ในปัจจุบัน เพื่อการใช้ประโยชน์ในการแก้ปัญหาการระบาดของโรคและยกระดับความสามารถในการผลิตในอุตสาหกรรมการผลิตอ้อยของไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ : เก็บตัวอย่างใบอ้อย ในพื้นที่จังหวัดอุดรธานีและขอนแก่น นำตัวอย่างใบอ้อยและพืชอื่นๆ รวม 300 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยหั่นเป็นชิ้นให้ละเอียด บดตัวอย่างมันสำปะหลังกับไนโตรเจนเหลวในโถรงบดยา ให้ตัวอย่างพืชละเอียดเป็นผง เติม CTAB Buffer และสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB การจากรายงานของ Li and Midmore (1999) ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอพืชด้วย Nanodrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, ThermoScientific, USA) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อในตัวอย่างแต่ละอาการด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง 16S-23S rDNA (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การออกแบบไพรเมอร์: ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนบริเวณ *Imp* gene เป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่สามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย (Morton *et al.*, 2003) ได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 3 คู่สาย โดยประกอบด้วย inner primers (FIP และ BIP), outer primers (F3 และ B3) และ Loop primer (LoopF และ LoopB) โดยใช้โปรแกรม Primer Explorer program version5 (<http://primerexplorer.jp/lamp5.0.0/index.html>) รวมทั้งการศึกษาความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วย โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากนั้นทดสอบปฏิกิริยา LAMP เพื่อดูว่าอุณหภูมิใดเหมาะสมที่สุด หรือเวลาที่ใช้เป็นต้น โดยใช้ยาสำเร็จรูป Lava Lamp DNA Master Mix (Lucigen, USA) ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermo static colorimeter (Kaneka Cooperation, Japan)

การทดสอบความจำเพาะ: ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP กับเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดอื่นๆ การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไฟโตพลาสมาถูกแบ่งออกเป็น positive specificity ซึ่งจะเป็นการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมา ที่ทราบชนิดได้แก่ เชื้อไฟโตพลาสมา (SWL) ส่วน negative specificity จะทดสอบกับไฟโตพลาสมาชนิดอื่น ๆ

การทดสอบความไว: นำดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 ng/μl มาเจือจาง 10-fold dilution 10^1 - 10^{10} เปรียบเทียบความไวในการตรวจในการตรวจผลผลิต LAMP ด้วยการอ่านผลด้วยเครื่องวัดความขุ่นแบบ real time เปรียบเทียบกับการ gel electrophoresis และเปรียบเทียบความไวในการตรวจกับเทคนิค nested PCR ตามวิธีการของ ศุจิรัตน์และคณะ (2559)

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแฉ่งด้วยเทคนิค Nested-PCR : การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ MLOX/Y : ปริมาตรรวม 15 μl ประกอบด้วย 75 ng DNA template, 0.5 μM primer (MLO/X : 5' GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC 3', MLOX/Y : 5' GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC 3'), 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase รอบการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย 95°C / 2 นาที ตามด้วย 95°C / 1 นาที 55°C / 30 วินาที 72 °C / 1 นาที จำนวน 24 รอบ ตามด้วย 72°C / 7 นาที เก็บรักษาที่ 25°C ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ 700 bp การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ P1/P2 ใช้ผลผลิตจากชุดที่ 1 เจือจาง 1:100 ปริมาตรรวม 15 μl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 3 μl, 0.5 μM primer P1 (5' GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG 3') และ P2 (5' GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC 3'), 1X PCR buffer, 1mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase รอบการทำพีซีอาร์ประกอบด้วย 95°C / 2 นาที ตามด้วย 94°C / 1 นาที 60°C / 30 วินาที 72 °C / 1 นาที จำนวน 24 รอบ ตามด้วย 72°C / 7 นาที เก็บรักษาที่ 25°C ขนาด

ผลผลิต 210 bp ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis โดยใช้สียฟลูออเรสเซนซ์ SYBR gold การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้เครื่อง GeneAmp9700 บันทึกผลด้วย Gel Documentation ผลบวก คือ ตรวจพบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (Sakuanrungrsirikul *et al.*, 2013, 2015; Hanboonsong *et al.*, 2006) เปรียบเทียบจำนวน copy number ของเชื้อไฟโตพลาสมาใช้พลาสมิดลูกผสม pUC1318 ที่มีชิ้นส่วนของ 16S -23S rDNA ขนาด 1,200 bp เป็นต้นแบบในการตรวจ ทำการคำนวณ copy number ของพลาสมิดลูกผสม ดังนี้ $Number = (amount (ng) * 6.022 \times 10^{23}) / (length (bp) * 1 \times 10^9 * 650)$ โดย 650 คือ น้ำหนักเฉลี่ยของ base pair (bp)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การออกแบบไพรเมอร์: ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *Imp* จากลำดับเบสในงานวิจัยของ Kakizawa *et al.*, 2009 และจากงานวิจัยของศุจิรัตน์และคณะ 2020 จากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว มาทำการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากเป็นบริเวณที่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมา ออกจากเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ใกล้เคียง เช่น ได้มีตำแหน่งการเข้าจับที่ตำแหน่งเบส 120 ถึง 350 บน ยีน 16S ribosomal RNA gene และมีค่า Melting Temperature (Tm) ของเส้นไพรเมอร์ B3, F3, BIP และ FIP อยู่ที่ 49.8 °C 50.9 °C 66.4 °C และ 66.5 °C (Table 1) ตามลำดับ

ความไว (sensitivity) ของวิธีการ LAMP: ทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอมันสำปะหลังที่ติดเชื้อ Sugarcane white leaf เจือจาง 10 เท่า จำนวน 10 ระดับ จากเริ่มต้นที่ 10^0 ถึง 10^{-10} การวิเคราะห์จำนวน copy number ต่ำสุดของเชื้อไฟโตพลาสมาที่สามารถตรวจจับได้ ทดสอบโดยใช้พลาสมิดลูกผสม pUC1318 ที่มีชิ้นยีนขนาด 700 bp นำมาเจือจาง ตรวจวัดความเข้มข้นของพลาสมิดที่ได้ และคำนวณจำนวน copy number ตั้งต้นก่อนทำการตรวจด้วยวิธี Nested-PCR ผลการทดลองพบว่า วิธี LAMP และ nested-PCR ที่ผลผลิตขนาด 210 bp สามารถตรวจได้ระดับต่ำถึง 1×10^{-1} copy/ μ l ส่วน nested-PCR ที่ผลผลิตขนาด 700 bp ตรวจ ได้ที่ 2×10^2 copies/ μ l (Table 2) (Figure 2)

ความจำเพาะในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่: ในการตรวจความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอจากพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดอื่น ได้แก่ มันสำปะหลังติดเชื้อโรคพุ่มแจ้และหญ้าที่แสดงอาการพุ่มแจ้ ผลการทดสอบพบว่า ไม่สามารถตรวจเชื้อดังกล่าวได้ ในการตรวจความครอบคลุมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อย ทดสอบโดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากอ้อยที่ติดโรคใบขาวที่ทำการตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อแล้วด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (Figure 3)

การตรวจตัวอย่างอ้อยที่มีอาการใบขาวด้วยเทคนิคแลมป์: สํารวจและเก็บตัวอย่างอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยใน อำเภอเมือง อำเภอแม่จางาศรี จังหวัดขอนแก่น อำเภอจรัล อำเภอพิมาย นครราชสีมา จำนวนรวม 300 ตัวอย่าง ผลการตรวจตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค LAMP ที่พัฒนาขึ้นพบการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว จำนวน 300 ตัวอย่าง คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ โดยกรรมวิธีควบคุมไม่มีเชื้อไม่แสดงผลบวก (Table 2)

วิจารณ์ผล

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยปัจจุบันใช้เทคนิค PCR-based ซึ่งรวมถึง quantitative polymerase chain reaction (qPCR) โดยยื่นเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจ ได้แก่ 16S rRNA gene *Imp* และ *secA* gene (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ, 2556; Cai, *et al.*, 2008, Lee *et al.*, 2012, Bertaccini *et al.* 2014, Sakuanrungrsirikul *et al.*, 2013, Hanboonsong *et al.*, 2006, Hodgetts *et al.*, 2008) โดยที่ *secA* gene เป็น single-copy gene ในจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมา และ rRNA นั้นมีรายงานว่า มี 2 copies วิธีการตรวจแต่ละวิธีที่ใช้ในปัจจุบันมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป และเป็นที่ยอมรับกันว่า การใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ชุดเดียว (simple PCR) มีความไวในการตรวจจับน้อยกว่า nested-PCR ที่ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์จากชุดที่หนึ่งมาตรวจเพิ่มในชุดที่สอง แต่วิธีการนี้มักเกิดการปนเปื้อนที่ทำให้เกิดผลบวกปลอม ในขณะที่ simple PCR จะทำให้เกิดผลลบปลอมจากความไวในการตรวจจับที่น้อยกว่า แม้ว่าการใช้ high stringent condition จะถูกนำมาใช้ในการเพิ่มความจำเพาะ และลดการปนเปื้อนในปฏิกิริยาแต่จะส่งผลเสียคือเกิดผลลบปลอมได้ (Lorence, 2012) การใช้ Agarose gel electrophoresis ในการตรวจผลอาจทำให้เกิดการแปลผลผิดได้ง่ายหากใช้ความเข้มแสงที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม ซึ่งจะทำให้มองไม่

เห็นแถบที่มีขนาดบางได้ ดังนั้นในการใช้วิธีการนี้ตรวจสอบผลต้องให้ความระมัดระวังการให้ความเข้มแสงในการอ่านผลด้วย นอกจากนี้การตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอ แสดงถึงปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายต่ำกว่าความไวของวิธีการที่จะตรวจจับได้ ดังนั้นในการรายงานผลจึงต้องคำนึงถึงรายละเอียดดังกล่าวนี้ด้วย ในส่วนของการใช้ quantitative realtime PCR (qPCR) นั้น ความไวของเครื่องมือทำให้เกิดปัญหาหากผู้ใช้งานไม่มีความชำนาญที่มักเกิดจากเทคนิคของผู้ปฏิบัติงาน และนอกจากนี้แล้ว ความสามารถในการวิเคราะห์ของวิธีการ (analytical performances) ของ qPCR จะถูกจำกัดโดยประสิทธิภาพ (efficiency) และช่วงผลตรวจที่ยอมรับได้ (acceptable ranges) ซึ่งจากรายงานส่วนใหญ่แล้วพบว่าความไวในการตรวจของวิธีการที่ใช้ qPCR นั้นเกือบเทียบเท่ากับการใช้ simple PCRs (Bastein *et al.*, 2008) คือประมาณ 10-100 copy/ μ l ของเซลล์เป้าหมาย ซึ่งเป็นระดับที่อาจใช้ได้ในการคัดกรองโรค แต่มีปัญหาในการขยายพันธุ์ปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในการทดลองนี้แสดงผลของการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยด้วยเทคนิค LAMP เปรียบเทียบกับวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ Nested-PCR พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวมากกว่า simple PCR ถึง 1000 เท่า (Table 2) ซึ่งผลนี้สนับสนุนข้อดีของชุดไพรเมอร์ที่จับดีเอ็นเอเป้าหมายถึง 3 จุด และชุดน้ำยาที่ใช้สารเรืองแสง (Figure 1) โดยที่ความไวของ LAMP ที่ได้นี้เทียบเท่ากับการตรวจด้วย nested-PCR ในระดับที่ทดสอบในการทดลองนี้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ได้ทดสอบการตรวจจับใน ดีเอ็นเอที่มีการเจือจางที่สูงกว่านี้ หรือในระดับที่ตรวจจับไม่ได้ด้วย nested-PCR ซึ่งหากตรวจถึงในระดับนั้น จะสามารถระบุความไวของ LAMP และ nested-PCR ที่ใช้นี้ได้อย่างแท้จริง

ข้อดีของ LAMP คือ ใช้งานง่าย และปนเปื้อนได้น้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับวิธี nested-PCR ทั้งยังใช้เครื่องมือไม่ซับซ้อน ระยะเวลาเพียง 60 นาทีเท่านั้นในการตรวจด้วย LAMP ซึ่งรวดเร็วกว่าการใช้ nested-PCR ที่ใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 2 วันจึงจะรู้ผลไพรเมอร์ของ LAMP ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ใช้ยีน *imp* ซึ่งเป็นยีนเจ้าบ้านในเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวเป็นเป้าหมาย จึงสามารถตรวจได้ครอบคลุมทั้ง 3 เชื้อ และมีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยเท่านั้น และไม่เกิด cross detection กับเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชอื่น การเกิดสีฟลูออเรสเซนส์ในปฏิกิริยาบอกทำให้ง่ายต่อการอ่านผล สามารถตรวจผลได้ด้วยตาเปล่า หากไม่มีเครื่องมือในการตรวจ ซึ่งจะทำให้หน่วยตรวจที่ไม่มีห้องปฏิบัติการระดับชีวโมเลกุลสามารถนำไปใช้ปฏิบัติได้ง่าย อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ใช้เครื่อง Thermo static colorimeter ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ราคาไม่สูงในการบันทึกผล สามารถรายงานผลในสภาพจริง (realtime) ได้ ซึ่งทำให้สามารถวิเคราะห์รูปแบบของการเกิดปฏิกิริยา ผลบวกปลอมที่เกิดจากการปนเปื้อนของปฏิกิริยา หรือจุดอิมตัวของปฏิกิริยาได้ ที่จะแสดงให้เห็นในลักษณะของระยะเวลาในเกิดกราฟค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งจะไม่สามารถตรวจสอบได้หากใช้วิธีการอ่านผลการเปลี่ยนสีฟลูออเรสเซนส์ด้วยตาเปล่าเพียงอย่างเดียว จากการตรวจวิเคราะห์ความไวของวิธีการ จะพบว่าวิธี LAMP ที่พัฒนาขึ้นนี้มีความไวในการตรวจจับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีเท่ากับ nested-PCR ในช่วงดีเอ็นเอที่ทดสอบในการทดลองนี้ และดีกว่าการตรวจด้วยการใช้เครื่อง Realtime PCR ที่ผลโดยทั่วไปที่ใช้ตรวจการติดเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยจะตรวจได้ในระดับต่ำเพียง 10-100 copy/ μ l เท่านั้น

สรุปผล

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยที่รวดเร็วด้วยเทคนิค LAMP โดยการออกแบบไพรเมอร์ตรวจจับตำแหน่งยีน *imp* ของเชื้อไฟโตพลาสมาและใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป พบว่าเป็นวิธีการที่มีความถูกต้องและครอบคลุมต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยทั้งสามชนิด คือ SCWL, SCGS และ SCGG ใน การทดลองนี้พบว่าวิธี LAMP มีความไวในการตรวจเทียบเท่ากับการทดสอบด้วยวิธี Nested-PCR ที่ใช้ยีน 16S-23S rDNA เป็นเป้าหมาย สามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้ต่ำที่สุดในระดับ 1.27×10^{-1} copy/ μ l ชุดไพรเมอร์ที่ได้ไม่สามารถตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคพุ่มแจ้ในมันสำปะหลังและอาการใบขาวในหญ้าได้ การตรวจผลโดยใช้เครื่อง Thermo static colorimeter ทำให้วิธีการมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้ Realtime PCR ใช้ระยะเวลาในการตรวจ ประมาณ 60 นาที รวดเร็วกว่าการตรวจด้วย nested-PCR ที่ใช้เวลาในการตรวจ ประมาณ 2 วัน ดังนั้นวิธี LAMP ที่ได้นี้นับได้ว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ง่าย ให้ผลรวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่าการใช้วิธีแบบเดิมในการตรวจโรคไฟโตพลาสมาในอ้อย สามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคใบขาว โรคใบขาวและกอฝอย และโรคกระทะไคร้ ในอ้อยเพื่อการตรวจรับรองแปลงพันธุ์สะอาดการคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์ สำหรับขยายพันธุ์ ของกลุ่มเกษตรกรในเครือข่ายโรงงานน้ำตาล และหน่วยงานกรมส่งเสริมการเกษตร อย่างไรก็ตาม Nested-PCR ยังคงเป็นวิธีที่จำเป็นในการคัดเลือกแม่พันธุ์เพื่อ

การขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเนื่องจากมีความไวสูงมาก ตรวจจับเป้าหมายที่มีปริมาณน้อยมากได้ การทดสอบเปรียบเทียบเพิ่มเติมระหว่าง LAMP และ nested-PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่มีการเจือจางที่สูงกว่าในการทดลองนี้ จนถึงระดับที่ตรวจจับไม่ได้ด้วย nested-PCR จะทำให้สามารถระบุความไวที่แท้จริงของวิธี LAMP นี้เทียบกับวิธี Nested-PCR ได้ เพื่อการตรวจรับรองแปลงพันธุ์สะอาดการคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์ สำหรับขยายพันธุ์ ของกลุ่มเกษตรกรในเครือข่าย โรงงานน้ำตาล และหน่วยงานกรมส่งเสริมการเกษตร

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ JIRCAS และ บริษัท Kaneka Cooperation ที่สนับสนุนเครื่อง Thermostatic colorimeter ในการตรวจปฏิกิริยา LAMP และขอบคุณผู้ช่วยวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ช่วยให้การปฏิบัติงานวิจัยสำเร็จตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ ศุภกาญจน์ ล้วนมณี สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และเกษม ชูสอน. 2554. ปัจจัยทางการเกษตรที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวของอ้อย. หน้า 63-68. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.
- สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล อีรวุฒิ วงศ์วัฒน์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ รังสี เจริญสถาพร ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ และกอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2558. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 69-89.
- สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล อีรวุฒิ วงศ์วัฒน์ สุนี ศรีสิงห์ ปิยะดา อีระกุลพิสุทธิ. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. ว. แก่นเกษตร ปีที่ 40 ฉบับพิเศษ 3 หน้า 231-240.
- สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล อีรวุฒิ วงศ์วัฒน์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์. 2556. SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2555. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-15.
- Abeyasinghe, S., Kanatiwela-de Silva, C., Abeyasinghe, P. D., Udagama, P., Warawichanee, K., Aljafar, N., Kawicha, P., and Dickinson, M. 2016. Refinement of the taxonomic structure of 16SrXI and 16SrXIV phytoplasmas of gramineous plants using multilocus sequence typing. *Plant Dis.* 100:2001-2010
- Bastien, P., Procop, G.W. and Reischl, U. 2008. Quantitative Real-Time PCR is not more sensitive than “Conventional” PCR. *J. Clin. Microbiol.* Vol. 46, No. 6. p. 1897-1900
- Bertaccini A, Duduk, B, Paltrinieri, S. and Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. *Am. J. Plant. Sci.* 5:1763-1788.
- Cai, H., Wei, W., Davies, R.E., Chen, H., and Zhao, Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches' broom phytoplasma group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1448-1457.
- Hanboonsong, Y., Choosai, C., Panyim, S. and Damak, S. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Mol. Biol.* 11, 97-103.
- Hanboonsong, Y., Ritthison, W., Choosai, C. and Sirithorn, P. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *J. Econ. entomol.* 99, 1531-1537.

- Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N. and Dickson, M. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1826-1837
- IRPCM. 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(4):1243–1255.
- Kakizawa, S., K. Oshima, Y. Ishii, A. Hoshi, K. Maejima, H.Y. Jung, Y. Yamaji, and S. Namba. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiology Lett*; 293.
- Lee I-M, Bottner-Parker, K.D., Zhao, Y., Bertaccini, A. and Davis, R.E. 2012. Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches' broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:2279–2285.
- Li, M. and Midmore, D.J. 1999. Estimating the genetic relationships of chinese water chestnut (*E. dulcis* (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPD. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 74(2): 224-231.
- Lorenz T. C. 2012. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J. vis. exp: JoVE*, (63), e3998. <http://doi.org/10.3791/3998>.
- Marcone, C. 2002. Phytoplasma diseases of sugarcane. *Sugar Tech.* 4: 79-85.
- Matsumoto T., Lee, C.S. and Teng, W.S. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special references to transmission by leafhopper, *Epitettix higrlyphicus* Mats. *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists* 13, 1090-1418.
- Mitrovic, J., Kakizawa, S., Duduk, B., Oshima, K., Namba, S. and Bertaccini, A. 2011. The *groEL* gene as an additional marker for finer differentiation of 'Candidatus Phytoplasma asteris'-related strains. *Ann. Appl. Biol.*, 154(2): 219-229.
- Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 16(3): 223-9.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28(12), E63.
- Rao, G.P., Mall, S. and Marcone, C. 2012. Recent Biotechnological Approaches in Diagnosis and Management of Sugarcane Phytoplasma Diseases. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 6 (Special issue 2), 19-29.
- Sakuanrungrasirikul, S., Wongwarat, T., Sankot, S., Kawabe, K., Kobori, Y. and Ando, S. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and the detection methods. *Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol.*, 28, 2013.
- Sugawara, K., M. Himeno, T. Keima, Y. Kitazawa, K. Maejima, K. Oshima, and S. Namba. 2012. Rapid and reliable detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification targeting a housekeeping gene. *J. Gen. Plant Pathol.* 78:389–397.
- Tomlinson, J.A., Dickinson, M.J. and Boonham, N. 2010. Detection of *Botrytis cinerea* by loop-mediated isothermal amplification. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 650–657. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02949>.
- Tomotada, I., Toshiaki, S. and Kozaburo, H. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2616–2622. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003>

Zhang, R.Y, Li, W.F, Huang, Y.N, Wang, X.Y, Shan, H.L, Luo, Z.M, and Yin, J. 2016. Group 16SrXI phytoplasma strains, including subgroup 16SrXI-B and a new subgroup, 16SrXI-D, are associated with sugar cane white leaf. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 487–491.

Table 1 LAMP Primers form Sugarcane White Leaf phytoplasma

label	Length	Sequence
F3	22	TATTATTTTCAGATGGTGGCCTT
B3	24	TTATCCAATGCTTTTGCAAGCTTA
FIP	47	AAACTAAACGAAAAGACAATAAAAAAATTTGAAAAAGAAATAGTACT
BIP	26	TCTAGTTATGTCAAATCTGACTTTAA
LoopF	31	TGCGGATAAAGCTGAAAAAGCTTTAAAAGAA
LoopB	22	TCAATAAATGAACTAAAAGTAG

Table 2 Detection sensitivity of the LAMP technique targeting phytoplasma *Imp* gene and Nested-PCR technique targeting phytoplasma 16S-23S rDNA gene in the DNA of infected sugarcane leaves. Plasmids pUC1318 containing 700 bp 16S-23S rDNA fragment was used for copy number estimation.

DNA serial dilution	LAMP (DNA)	Nested PCR (DNA)		Nested PCR plasmid DNA		<i>Imp</i> plasmid DNA (copy/ μ l)
		700 bp	210 bp	700 bp	210 bp	
10 ⁰	+	+	+	+	+	9
10 ⁻¹	+	+	+	+	+	4x10 ⁸
10 ⁻²	+	+	+	+	+	9x10 ⁷
10 ⁻³	+	+	+	+	+	8x10 ⁶
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	7x10 ⁵
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	6x10 ⁴
10 ⁻⁶	+	+	+	+	+	1x10 ³
10 ⁻⁷	+	+	+	+	+	2x10 ²
10 ⁻⁸	+	-	+	-	+	4x10 ¹
10 ⁻⁹	+	-	+	-	+	9x10 ⁰
10 ⁻¹⁰	+	-	+	-	+	1x10 ⁻¹

NT: not tested +: positive -: negative

Plasmid concentration was quantified by nanometer. Plasmid copy number was calculated as (amount (ng) 6.022x10²³) / (length (bp) * 1x10⁹* 650): 650 is average weight of base pair.

Table 3 The LAMP result of phytoplasma Sugarcane white leaf samples.

Sampling site	Locality coordinating	No. of sample	LAMP technique	
			detected	undetected
Khon Kaen				
Mancha Khiri	16.22020 °N,102.53630°E	150	150	0
Muang	16.38880 °N, 102.8497 °E			
Udonthani				
Kumphawaphi	17.05051 °N, 102.9383 °E	150	150	0
Non Sa-at	16.98419 °N,, 102.9116 °E			
Total		300	300	0

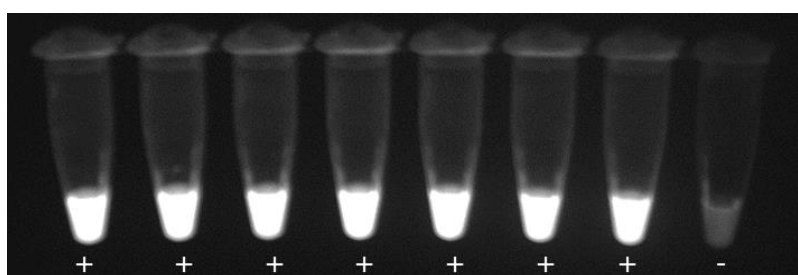


Figure 1. LAMP reactions illustrating detection sensitivity in the diluted DNA samples extracted from leaves of SCWL infected sugarcane. No.1-7: samples with DNA dilutions: 1, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸,10⁻¹⁰, respectively. No.8: negative control (water).

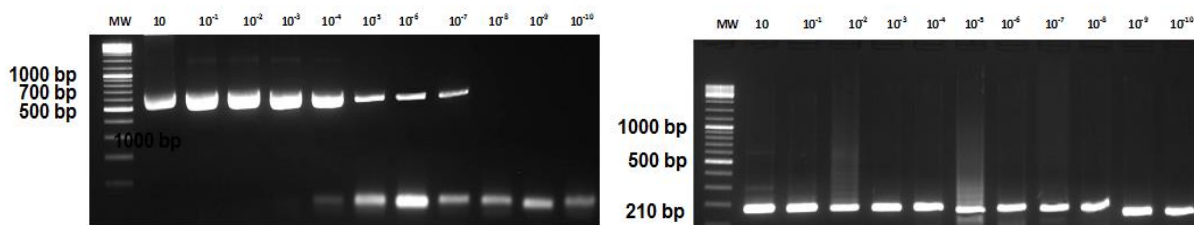


Figure 2. Nested-PCR products illustrating detection sensitivity in the diluted DNA samples extracted from leaves of SCWL infected sugarcane. Lane 1: 1 kb DNA molecular weight. Lanes 2-12: samples dilution: 10-10⁻¹⁰. Left: 700 bp PCR products by MLO-X/Y primer set. Right: 210 bp PCR products by P1/P2 primer set.

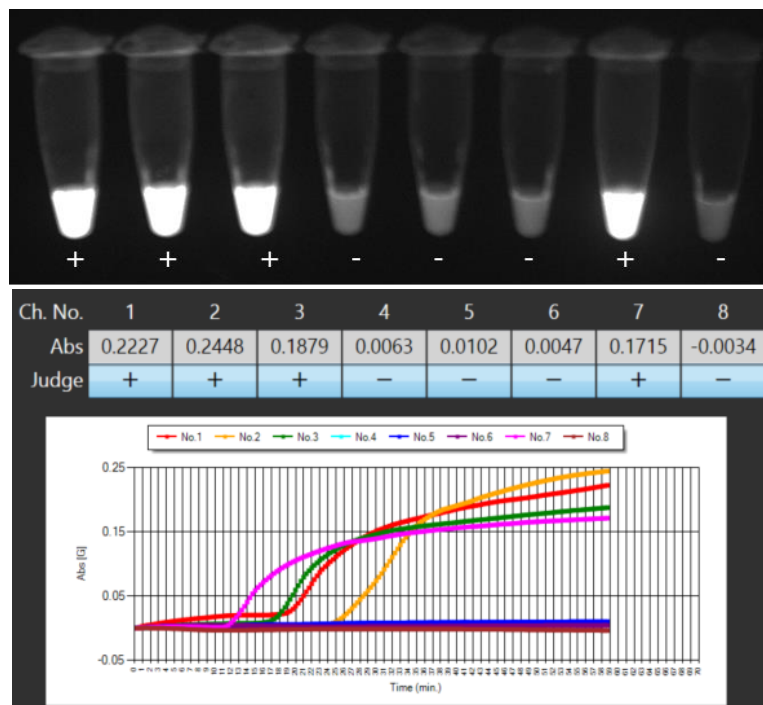


Figure 3. LAMP reactions illustrating accuracy and broad spectrum of the primer set. No 1-3 : DNA extracted from leaves of sugarcane infected with SCWL, SCGS and SGGS. No 4-6: DNA samples from leaves of grass with white leaf symptom and cassava with witch’s broom disease. No.8: negative control (water). Above: absorbance values of the LAMP reactions at 60 minutes. Below: fluorescence real time signaling reported by a Thermostatic colorimeter.



การควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์
โดยการคลุกเมล็ดและพ่นสารทางใบ

Controlling Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) Infestation Through Seed
Treatments and Foliar Spraying in Maize

สมคิด พันธุ์ดี^{1*} ศิวีไล ลาภบรรจบ¹ วิภาดา ปลอดครบุรี² และพฤทธิชาติ ปุญวัฒน์³
Pandee, S.^{1*}, Lapbanjob, S.¹ Plodkornburee, W.² and Punyawattoe, P.³

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ , นครสวรรค์, 60190

¹ Nakhon Sawan Field Crops Research Center, Nakhon Sawan, 60190

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรโนนสูง, นครราชสีมา, 30160

² Nonsung Agricultural Research and Development Center, Nakhon Ratchasima, 30160

³ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช , กรุงเทพฯ, 10900

³ Department of Agriculture, Bangkok, 10900

*entomopathologist72@hotmail.com

บทคัดย่อ

หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด *Spodoptera frugiperda* เป็นแมลงศัตรูสำคัญในข้าวโพดที่พบการแพร่ระบาดในประเทศไทย โดยระยะหนอนกัดกินใบ ยอด และฝักข้าวโพด สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการใช้สารกำจัดแมลงแบบคลุกเมล็ดและพ่นสารทางใบเพื่อควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ดำเนินการในปี 2565-2566 ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ นครสวรรค์ การคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดแมลงไซแอนทรานิลิโพรล 24%FS ผสมไทอะมีโทแซม 24%FS อัตราการใช้ 7 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม การพ่นสารทางใบด้วยสารกำจัดแมลงสไปนีโทแรม 12%SC อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร วางแผนการทดลองแบบ RCBD กรรมวิธีประกอบด้วยระยะเวลาในการป้องกันกำจัดที่ต่างกัน 10 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ ตรวจสอบระดับความเสียหายของใบพืช พบว่าการพ่นสารที่ข้าวโพดอายุ 7 และ 14 วัน หลังงอกและพ่นสารที่ 7, 14, 21 และ 35 วันหลังงอก ส่งผลให้ระดับความเสียหายของใบข้าวโพดลดลงเช่นเดียวกันกับการคลุกเมล็ดร่วมกับพ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 14, 21, และ 35 วันหลังงอก ผลผลิตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1,233-1,518 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อวิเคราะห์ผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์พบว่า การพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเมื่อข้าวโพดอายุ 7 และ 14 วันหลังงอก 2 ครั้ง ให้ผลตอบแทนคุ้มค่ามากกว่าวิธีการอื่นๆ (BCR = 3.45)

คำสำคัญ : หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ การพ่นสารทางใบ การคลุกเมล็ด

Abstract

The Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) is a major pest of maize in Thailand. It is a highly destructive insect, feed on the leaves, tassels, and ears of maize that can cause significant economic damage. The objective of this study, conducted in 2023 at the Nakhon Sawan Field Crops Research Center, to compare the effectiveness of seed treatment and foliar insecticides in controlling Fall Armyworm (*S. frugiperda*) in field maize. Seed treatment with cyantraniliprole 24% FS mixed with thiamethoxam 24% FS at a rate of 7 milliliters per kilogram of seeds. Foliar spray with insecticide using spinetoram 12% SC at a rate of 20 milliliters per 20 liters of water. The method consisted of 10 different protection periods of vegetative, with 3 repetitions each. It was found that the sprayed-on maize 7 and 14 days after germination, and the sprayed on 7, 14, 21, and 35 days after germination, resulted in a reduction in leaf damage as well as the seed treatments and spraying on

14, 21, and 35 days after germination. The yield of maize at 15 percent humidity had an average yield between 1,233-1,518 kilograms.ra⁻¹. When analyzing the benefit-cost ratio (BCR), it was found that Spraying at 7 and 14 days after germination, 2 times, gives a more worthwhile return than other methods (BCR = 2.45).

Keywords: Fall Armyworm, Maize, Foliar Spraying, Seed treatment

บทนำ

หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (Fall Armyworm) *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) ถูกจัดอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Noctuidae เป็นศัตรูกักกันพืชที่สำคัญต่อการส่งออกพืชและผลผลิตพืช และเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของข้าวโพด พบระบาดในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อนของทวีปอเมริกา (Prasanna *et al.*, 2018) วงจรชีวิตของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ใช้เวลา 30-45 วัน เมื่อผสมพันธุ์แล้วตัวเต็มวัยผีเสื้อเพศเมียจะวางไข่ในช่วงเวลากลางวัน โดยวางไข่เป็นกลุ่มไข่ จำนวน 100-200 ฟอง เพศเมียหนึ่งตัวจะวางไข่ได้ 1,500-2,000 ฟองตลอดช่วงชีวิตที่เป็นผีเสื้อ การเจริญเติบโตในระยะไข่ใช้เวลา 2-3 วัน ระยะหนอน 14-22 วัน ระยะหนอนมี 6 วัย เมื่อจะเข้าดักแด้นอนจะทิ้งตัวลงดินเพื่อเข้าดักแด้ ระยะดักแด้ใช้เวลา 7-13 วัน จึงเป็นตัวเต็มวัยและมีชีวิตอยู่ได้ 10-21 วัน ในตัวเต็มวัยสามารถบินได้ไกลเฉลี่ย 200 กิโลเมตรต่อคืน การเข้าทำลายพืชจะเริ่มในระยะที่เป็นตัวหนอน โดยหนอนเข้าทำลายตั้งแต่ข้าวโพดอายุ 7 วัน จนกระทั่งข้าวโพดออกฝัก หนอนจะกัดกินยอดและใบข้าวโพด เว้าแหงหรือกัดกินทั้งแผ่นใบ ทำลายช่อดอกตัวผู้ กัดกินไหม ฝัก และเมล็ด หากระบาดรุนแรงจะทำให้ผลผลิตเสียหายได้ถึง 73 เปอร์เซ็นต์ (FAO, 2017) การแพร่ระบาดของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดพบมากที่ข้าวโพดอายุไม่เกิน 45 วัน (Cruz *et al.*, 2010) สมคิด พันธุ์ดี และคณะ (2564) รายงานว่าพบการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดตั้งแต่ข้าวโพดอายุ 7 วันและมีระดับความเสียหายทางใบสูงเมื่อข้าวโพดอายุ 28 วัน หลังจากนั้นความเสียหายทางใบจะลดลง

การพ่นสารกำจัดแมลงทางใบนั้นเกษตรกรมักพ่นสารป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดมากกว่า 1 ครั้ง ช่วงระยะเวลาในการพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชไม่มีการวางแผนที่แน่นอน และมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเกิดระบาดในแปลงปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และการป้องกันกำจัดไม่สามารถทำได้อย่างเหมาะสม การพ่นสารทางใบหลายครั้งภายในหนึ่งฤดูปลูกอาจส่งผลให้หนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเกิดความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในอนาคตและส่งผลกระทบต่อแมลงศัตรูธรรมชาติ เช่น มวนพิฆาตและมวนเพศฉวมชาติ ซึ่งเป็นศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (สาทิพย์ มาลี และคณะ, 2565) งานวิจัยนี้จึงศึกษาการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยการคลุกเมล็ดและพ่นสารทางใบที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม จะส่งผลให้การป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดมีประสิทธิภาพ อาจช่วยชะลอการสร้าง ความต้านทานต่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชและส่งเสริมการอนุรักษ์ศัตรูธรรมชาติ ลดต้นทุนการผลิตและเป็นข้อมูลสำหรับแนะนำเกษตรกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์ประกอบด้วย เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์ กว.นครสวรรค์5 และเตรียมสารคลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดแมลงไซแอนทรานิลิโพรล (cyantraniliprole) 24%FS ผสมไทอะมีโทแซม (thiamethoxam) 24%FS และสารพ่นทางใบใช้สารกำจัดแมลงสไปนีโทแรม (spinetoram) 12%SC

ในการทดลองครั้งนี้วางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block จำนวน 3 ซ้ำ 10 กรรมวิธี โดยกรรมวิธีเป็นวิธีการป้องกันกำจัดโดยการคลุกเมล็ดและการพ่นสารป้องกันกำจัดแมลง ดังนี้

1. พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเมื่อข้าวโพดอายุ 7 และ 14 วันหลังออก รวม 2 ครั้ง
2. พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเมื่อข้าวโพดอายุ 7, 14 และ 35 วัน หลังออก รวม 3 ครั้ง
3. พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเมื่อข้าวโพดอายุ 14 และ 35 วัน หลังออก รวม 2 ครั้ง
4. พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเมื่อข้าวโพดอายุ 14, 21 และ 35 วันหลังออก รวม 3 ครั้ง
5. พ่นสารป้องกันกำจัดแมลงเมื่อข้าวโพดอายุ 7, 14, 21 และ 35 วัน หลังออก รวม 4 ครั้ง
6. คลุกเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดแมลง

7. คลุกเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดแมลง ร่วมกับการพ่นสาร 1 ครั้ง เมื่อข้าวโพดอายุ 35 วัน หลังออก
8. คลุกเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดแมลง ร่วมกับการพ่นสาร 2 ครั้ง เมื่อข้าวโพดอายุ 21 และ 35 วัน หลังออก
9. คลุกเมล็ดด้วยสารป้องกันกำจัดแมลง ร่วมกับการพ่นสาร 3 ครั้ง เมื่อข้าวโพดอายุ 14, 21 และ 35 วัน
10. ไม่มีการป้องกันกำจัดตลอดฤดูปลูก

วิธีปฏิบัติการทดลอง

คลุกเมล็ดด้วยสารกำจัดแมลงไซแอนทรานิลิโพรล (cyantraniliprole) 24%FSผสมไทอะมีโทแซม (thiamethoxam) 24%FS อัตราการใช้ 7 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด 1 กิโลกรัม และสารพ่นทางใบใช้สารกำจัดแมลงสไปนีโทแรม (spinetoram) 12%SC อัตราการใช้ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร อัตราการพ่นสารป้องกันกำจัดแมลงด้วยเครื่องพ่นสารแบบเตอร์รี่ ในระยะข้าวโพดอายุ 1-2 สัปดาห์ ใช้น้ำพ่นไร่ละ 40 ลิตร ข้าวโพดอายุ 3-4 สัปดาห์ ใช้น้ำพ่นไร่ละ 50 ลิตร และข้าวโพดอายุ 5 สัปดาห์ขึ้นไปใช้น้ำไร่ละ 80 ลิตร (ศรีจันทร์ ศรีจันทร์, 2565)

ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ กว.นครสวรรค์5 แถวยาว 5 เมตร จำนวน 10 แถวต่อแปลงย่อย ใช้ระยะปลูก 75x20 เซนติเมตร หยอด 2 เมล็ดต่อหลุม ใส่ปุ๋ยเคมี 15-15-15 อัตรา 40 กิโลกรัมต่อไร่ โดยโรยกันหลุมพร้อมปลูก หลังปลูกพ่นสารกำจัดวัชพืช atrazine อัตรา 300 กรัมสารออกฤทธิ์ต่อไร่ หลังข้าวโพดงอก 2 สัปดาห์ ถอนแยกให้เหลือ 1 ต้นต่อหลุม เมื่อข้าวโพดอายุ 3 สัปดาห์ ใส่ปุ๋ยเคมี 46-0-0 อัตรา 30 กิโลกรัมต่อไร่ โรยข้างแถวข้าวโพดแล้วพรวนดินกลบ เริ่มประเมินความเสียหายทางใบจากการทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดหลังข้าวโพดงอก 7 วัน โดยสุ่มต้นข้าวโพดใน 4 แถวกลาง แถวละ 5 ต้น โดยใช้ระดับการทำลายของ Davis and William (1992) 1-9 โดยระดับ 1 ไม่พบร่องรอยการทำลาย ไปจนถึงระดับ 9 ใบถูกทำลายเกือบทั้งหมด นำระดับการทำลายที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การทำลาย โดยใช้สูตรของ Townsend and Heuberger (1943)

$$\text{การทำลาย (\%)} = \frac{\sum (nv) \times 100}{NV}$$

n = จำนวนต้นในแต่ละระดับการทำลาย

v = คะแนนระดับการทำลาย

N = จำนวนต้นทั้งหมดที่สุ่มนับ

V = คะแนนระดับการทำลายสูงสุด

เก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวโพดจาก 4 แถวกลาง ประเมินความเสียหายของฝักข้าวโพด ตามวิธีการของ CIMMYT (2018) โดยเกณฑ์การให้คะแนน 1-9 โดยคะแนนเท่ากับ 1 คือ ไม่พบรอยทำลายที่ฝัก และคะแนนเท่ากับ 9 คือ ฝักเสียหาย 90-100% ของฝัก

การบันทึกข้อมูล

จดบันทึกข้อมูลการปฏิบัติงาน ระบุวันออก ผลการเจริญเติบโต วัดความสูง วันออกดอก ระดับความเสียหายของใบข้าวโพด ระดับความเสียหายของฝักข้าวโพด ผลผลิตข้าวโพด จำนวนฝักที่ถูกทำลายต่อแปลงย่อย วัดความชื้นเมล็ดขณะเก็บเกี่ยว (%RH) เปอร์เซ็นต์กะเทาะ ผลผลิต (กิโลกรัมต่อไร่) ข้อมูลสภาพภูมิอากาศ ผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์ อัตราส่วนผลตอบแทนต่อต้นทุน (Benefit-Cost Ratio: BCR)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองปี 2565

ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์ กว.นครสวรรค์5 เมื่อวันที่ 7 กรกฎาคม 2565 สารคลุกเมล็ดที่ใช้คือ ไซแอนทรานิลิโพรล 24%FS + ไทอะมีโทแซม 24%FS อัตรา 7 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพันธุ์ 1 กิโลกรัม สารป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดที่ใช้พ่นทางใบคือ สไปนีโทแรม 12%SC ใช้เครื่องพ่นสารแบบเตอร์รี่ หลังจากข้าวโพดงอก 7 วันจึงพ่นสารตามกรรมวิธีต่างๆ พบว่าระดับความเสียหายของใบข้าวโพดหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเมื่อพ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 14, 21 และ 35 วันหลังงอก พ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 7, 14, 21 และ 35 วันหลังงอก และการคลุกเมล็ดร่วมกับพ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 14, 21 และ 35 วัน ส่งผลให้ระดับความเสียหายของใบข้าวโพดต่ำ ตั้งแต่ข้าวโพดอายุ 21 วันจนถึง 42 วันหลังงอก หลังจากนั้นความเสียหายทางใบลดลงและไม่ต่างกันทางสถิติจนถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิต (Table 1) เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อวันที่ 18 ตุลาคม 2565 (100 วัน) ผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ของทุกกรรมวิธีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 711-837 กิโลกรัมต่อไร่ และไม่แตกต่างทางสถิติ เปอร์เซ็นต์กะเทาะอยู่ระหว่าง 69.13-75.66 เปอร์เซ็นต์ ประเมินความเสียหายฝักพบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ มีค่าความ

เสียหายฝักระดับ 1.06 คิดเป็นร้อยละ 11.03 (Table 2) เมื่อคำนวณผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์จากการวิเคราะห์สัดส่วนรายได้ต่อการลงทุน (Benefit-cost ratio, BCR) พบว่า ในทุกกรรมวิธีมีค่า BCR มากกว่า 1 เฉลี่ย 1.42 ซึ่งคุ้มค่าต่อการลงทุน กำไรสุทธิเฉลี่ย 2,400 บาทต่อไร่ (Table 3)

ผลการทดลองปี 2566

ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์ กว.นครสวรรค์ 5 เมื่อวันที่ 13 กรกฎาคม 2566 สารคลุกเมล็ดที่ใช้คือ ไซแอนทรานิลิโพล 24%FS + ไทอะมีโทแซม 24%FS อัตรา 7 มิลลิลิตรต่อเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด 1 กิโลกรัม ใช้สารสไปนีโทแรม 12%SC พ่นทางใบด้วยเครื่องพ่นสารแบบเตอร์ หลังจากข้าวโพดงอก 7 วันจึงพ่นสารตามกรรมวิธีต่างๆ พบว่าระดับความเสียหายของใบข้าวโพดหลังการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดเมื่อพ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 7, 14, 21 และ 35 วันหลังงอก พ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 7, 14, 21 และ 35 วันหลังงอก และการคลุกเมล็ดร่วมกับพ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 14, 21 และ 35 วัน ส่งผลให้ระดับความเสียหายของใบข้าวโพดต่ำ ตั้งแต่ข้าวโพดอายุ 21 วันจนถึง 42 วัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่มีการป้องกันกำจัด หลังจากนั้นความเสียหายทางใบลดลงและไม่แตกต่างทางสถิติจนถึงวันเก็บเกี่ยวผลผลิต (Table 4) เก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อวันที่ 7 พฤศจิกายน 2565 (110 วัน) ผลผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1,233-1,518 กิโลกรัมต่อไร่ และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีที่ไม่มีการป้องกันกำจัด หลังจากประเมินความเสียหายฝักพบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ มีค่าความเสียหายฝักระดับ 1.11 คิดเป็นร้อยละ 11.08 (Table 5) เมื่อคำนวณผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์จากการวิเคราะห์สัดส่วนรายได้ต่อการลงทุน (BCR) พบว่า ในทุกกรรมวิธีมีค่า BCR มากกว่า 1 เฉลี่ย 3.00 ซึ่งคุ้มค่าต่อการลงทุน โดยการพ่นสารเมื่อข้าวโพดอายุ 7 และ 14 วันหลังงอก รวม 2 ครั้ง มีค่า BCR สูงสุดเท่ากับ 3.45 และมีกำไรสุทธิ 9,804 บาทต่อไร่ซึ่งมากกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ (Table 6)

ถึงแม้ว่าผลการทดลองในปี 2565 กรรมวิธีที่ไม่มีการป้องกันกำจัดจะมีค่า BCR มากกว่าการคลุกเมล็ดและการพ่นสารเกษตรกรรมพ่นสารป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดอย่างน้อย 2 ครั้งคือ 7 และ 14 วันหลังงอก เนื่องจากพบการระบาดสูงในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้นมากกว่าระยะติดฝักกล่าวคือตั้งแต่ข้าวโพดในระยะกล้าไปจนถึงข้าวโพดอายุ 35 วันหลังงอก (สมคิด พันธุ์ดีและคณะ, 2564) และประสิทธิภาพของสารสไปนีโทแรมสามารถป้องกันการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดได้นานถึง 14 วันหลังการพ่นสารในข้าวโพดและเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดน้อยกว่าการใช้สารคลุกเมล็ด (Rakesh *et al.* 2023)

สรุปผล

การป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยใช้สารสไปนีโทแรม 12% SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยใช้อัตราพ่นสาร 60-80 ลิตรต่อไร่เมื่อข้าวโพดอายุ 7 และ 14 วันหลังงอก สามารถลดการเข้าทำลายของหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุดในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และให้ผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์จากการวิเคราะห์สัดส่วนรายได้ต่อการลงทุน (BCR) เท่ากับ 3.45 ซึ่งมากกว่าวิธีป้องกันกำจัดวิธีอื่นๆ โดยให้กำไรสุทธิสูงสุด 9,804 บาทต่อไร่

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ และบุคลากรทุกท่านของศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ที่ให้ความร่วมมือและให้การสนับสนุนอย่างยิ่ง จึงสามารถดำเนินการทดลองได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีประสิทธิผล

เอกสารอ้างอิง

ศรีจันทร์ ศรีจันทร์. 2565. เอกสารวิชาการ คำแนะนำการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช จากงานวิจัยปี 2565. โครงการวิจัยและพัฒนาการใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อใช้เป็นคำแนะนำในการผลิตพืชบริโภคในประเทศและส่งออก. กรมวิชาการเกษตร. 208 หน้า.

- สมคิด พันธุ์ดี, ศิวไล ลาภบรรจบ, สุริพัฒน์ ไทยเทศ, วรกานต์ ยอดชมภู และพยุดา จันทร์เกื้อ. 2564. การประเมินความต้านทานของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ต่อการเข้าทำลายของหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (*Ostrinia furnacalis* Guenee) และหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith). การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 18 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 8-9 ธันวาคม 2564 หน้า 88-97
- สาทิพย์ มาลี, ประภัสสร เขยคำแหง, ณัฐฉิณี ศิริมาจันทร์, นันทนัช พินศรี และภัทรพร สรรพนุเคราะห์. 2565. ศึกษาผลกระทบของสารป้องกันกำจัดหนอนกระทู้ข้าวโพดลายจุด ต่อมวนพิฆาต *Eocanthecona furcellata* Woff และมวนพิฆาต *Sycanus versicolor* Dohrn. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2565 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 73-81.
- CIMMYT and USAID, 2018. Fall Armyworm in Africa: a guide for integrated pest management, First Edition, pp. 59-60.
- Cruz I., Figueiredo, L.C., Antonio C.O. and Carlos, A.V. 2010. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminum saturation. Journal of Pest Management, 293-296.
- Davis, F.M., and Williams, W.P. 1992. Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm. Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station, Technical Bulletin 186, Mississippi State University, MS39762, USA.
- FAO. 2019. Briefing note on FAO actions on fall armyworm. Plant Production and Protection Division. FAO. Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy.
- Prasanna, B.M., Huesing, J.E., Eddy, R. and Peschke, V.M. 2018. Fall armyworm in Africa: a guide for integrated pest management. First Edition.
- Rakesh, K.B., Murali, M.K. and Prabhu, C. 2023. Seed treatment with insecticides-a potential option against fall armyworm *Spodoptera frugiperda* in maize. Indian Journal of Entomology Online published Ref. No. e23329 .
- Townsend, G.R. and Heuberger, J.W. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. The Plant Disease Reporter, pp.340-343.



Table 1 Mean of leaf-feeding damaged rating scale caused by fall armyworm after application on maize at Nakhon Sawan Field

Crops Research Center. (Late rainy season: 2022) **Table 1** Mean of leaf-feeding damaged rating scale caused by fall armyworm after application on maize at Nakhon Sawan Field
Crops Research Center. (Late rainy season: 2022)

Treatments	Leaf-feeding damage rating scale (1-9)							
	Pre-spraying	7 DAE	14 DAE	21 DAE	28 DAE	35 DAE	42 DAE	49 DAE
Foliar spraying on maize at 7 and 14 DAE	1.05	1.16	1.67 a	1.95 a	4.18 b	4.12 bc	1.10	1.16
Foliar spraying on maize at 7, 14 and 35 DAE	1.05	1.05	1.37 a	2.26 ab	4.77 b	4.86 c	1.49	1.05
Foliar spraying on maize at 14 and 35 DAE	1.05	1.10	4.37 b	1.91 a	3.60 b	3.98 bc	1.19	1.10
Foliar spraying on maize at 14, 21 and 35 DAE.	1.05	1.14	3.52 b	2.23 ab	1.40 a	1.61 a	1.05	1.14
Foliar spraying on maize at 7, 14, 21 and 35 DAE	1.05	1.14	1.60 a	1.98 a	1.23 a	1.26 a	1.05	1.14
Seed treatment.	1.00	1.05	2.07 a	4.51 c	3.88 b	3.40 b	1.05	1.05
Seed treatment and foliar spraying on maize at 35 DAE	1.00	1.05	2.26 a	3.47 bc	4.07 b	3.30 b	1.05	1.05
Seed treatment and foliar spraying on maize at 21 and 35 DAE	1.00	1.09	1.98 a	4.33 c	1.40 a	1.72 a	1.05	1.09
Seed treatment and foliar spraying on maize at 14, and 21 35 DAE	1.00	1.09	2.37 a	2.86 ab	1.12 a	1.14 a	1.05	1.09
Untreated control	1.05	1.18	3.58 b	4.26 c	4.02 b	3.93 bc	1.05	1.18
Mean	1.05	1.10	2.48	2.98	2.97	2.93	1.11	1.10
F-test	ns	ns	**	**	**	**	ns	ns
C.V. (%)	10.03	8.48	24.00	25.13	25.07	23.69	21.75	8.48

DAE=Days after emergence of the plants

Means followed by the same letter within a column are not significantly different at 5% level of probability using Duncan Multiple Range Test (DMRT)

* Significant at 5% level of probability

** Significant at 1% level of probability

^{ns} Not significant

Table 2 Mean of plant height, shelling (%), yield and ear damaged rating scale caused by fall armyworm after application on maize at Nakhon Sawan Field Crops Research Center. (Late rainy season: 2022)

Treatments	Plant height (cm.)		Shelling (%)	Yield (Kg/rai)	Ear damaged rating scale (1-9)	Ear damaged (%)
	30 DAE	60 DAE				
Foliar spraying on maize at 7 and 14 DAE	83 a	217 ab	75.47	804	1.07	11.17
Foliar spraying on maize at 7, 14 and 35 DAE	82 a	215 ab	75.63	773	1.04	10.89
Foliar spraying on maize at 14 and 35 DAE	81 a	214 ab	73.92	794	1.05	10.98
Foliar spraying on maize at 14, 21 and 35 DAE.	84 a	221 ab	75.82	808	1.01	10.56
Foliar spraying on maize at 7, 14, 21 and 35 DAE	84 a	221 ab	70.30	719	1.10	11.50
Seed treatment.	85 a	212 ab	69.13	682	1.02	10.62
Seed treatment and foliar spraying on maize at 35 DAE	82 a	217 ab	75.64	711	1.08	11.22
Seed treatment and foliar spraying on maize at 21 and 35 DAE	86 a	219 ab	75.33	837	1.03	10.79
Seed treatment and foliar spraying on maize at 14, and 21 35 DAE	87 a	222 a	75.66	762	1.11	11.57
Untreated control	73 b	210 b	75.16	737	1.06	11.03
Mean	83	217	74.21	763	1.06	11.03
F-test	**	*	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	2.67	1.78	6.04	9.98	3.62	3.59

DAE=Days after emergence of the plants

Means followed by the same letter within a column are not significantly different at 5% level of probability using Duncan Multiple Range Test (DMRT)

* Significant at 5% level of probability

** Significant at 1% level of probability

^{ns} Not significant

Table 3 Mean of yield, total cost, total income, net income and benefit-cost ratio (BCR) on maize at Nakhon Sawan Field Crops Research Center. (Late rainy season: 2022)

Treatments	Yield (Kg/rai)	Total cost (baht/rai)	Total income (baht/rai)	Net income (baht/rai)	benefit-cost ratio (BCR)
Foliar spraying on maize at 7 and 14 days.	804	4,809	7,236	2,427	1.50
Foliar spraying on maize at 7 and 14 DAE	773	5,212	6,957	1,745	1.33
Foliar spraying on maize at 7, 14 and 35 DAE	794	4,809	7,146	2,337	1.49
Foliar spraying on maize at 14 and 35 DAE	808	5,212	7,272	2,060	1.40
Foliar spraying on maize at 14, 21 and 35 DAE.	719	5,615	6,471	856	1.15
Foliar spraying on maize at 7, 14, 21 and 35 DAE	682	4,129	6,138	2,009	1.49
Seed treatment.	711	4,533	6,399	1,866	1.41
Seed treatment and foliar spraying on maize at 35 DAE	837	4,935	7,533	2,598	1.53
Seed treatment and foliar spraying on maize at 21 and 35 DAE	762	5,338	6,858	1,520	1.28
Seed treatment and foliar spraying on maize at 14, and 21 35 DAE	737	4,003	6,633	2,630	1.66
Mean	763	4,859	6,864	2,004	1.42



Table 4 Mean of leaf-feeding damaged rating scale caused by fall armyworm after application on maize at Nakhon Sawan Field Crops Research Center. (Late rainy season: 2023)

Treatments	Leaf-feeding damage rating scale (1-9)							
	Pre-spraying	7 DAE	14 DAE	21 DAE	28 DAE	35 DAE	42 DAE	49 DAE
Foliar spraying on maize at 7 and 14 DAE	1.00	1.47 ab	1.39 a	1.68 a	4.86 b	6.60 b	1.39	1.05
Foliar spraying on maize at 7, 14 and 35 DAE	1.00	1.47 ab	1.28 a	1.39 a	5.32 b	6.86 b	1.54	1.05
Foliar spraying on maize at 14 and 35 DAE	1.00	2.60 d	3.02 b	1.35 a	5.84 b	6.77 b	1.76	1.05
Foliar spraying on maize at 14, 21 and 35 DAE	1.00	2.16 abcd	3.91 c	1.23 a	1.27 a	2.44 a	1.28	1.21
Foliar spraying on maize at 7, 14, 21 and 35 DAE	1.05	1.37 a	1.09 a	1.33 a	1.40 a	2.84 a	1.19	1.28
Seed treatment	1.00	1.88 abcd	2.49 b	7.00 b	7.09 c	7.24 b	1.96	1.05
Seed treatment and foliar spraying on maize at 35 DAE	1.00	1.67 abc	2.75 b	7.12 b	7.25 c	7.18 b	1.24	1.12
Seed treatment and foliar spraying on maize at 21 and 35 DAE	1.00	2.26 bcd	2.96 b	6.93 b	1.42 a	3.14 a	1.10	1.05
Seed treatment and foliar spraying on maize at 14, and 21 35 DAE	1.00	1.72 abc	2.55 b	1.28 a	1.23 a	2.86 a	1.48	1.26
Untreated control	1.05	2.42 cd	4.09 c	7.11 b	7.46 c	7.05 b	1.58	1.05
Mean	1.00	1.90	2.55	3.64	4.31	5.30	1.45	1.12
F-test	ns	*	**	**	**	**	ns	ns
C.V. (%)	8.03	23.54	19.81	9.55	13.51	8.09	24.86	13.28

DAE=Days after emergence of the plants

Means followed by the same letter within a column are not significantly different at 5% level of probability using Duncan Multiple Range Test (DMRT)

* Significant at 5% level of probability

** Significant at 1% level of probability

^{ns} Not significant



Table 5 Mean of plant height, shelling (%), yield and ear damaged rating scale caused by fall armyworm after application on maize at Nakhon Sawan Field Crops Research Center. (Late rainy season: 2023)

Treatments	Plant height (cm.)		Shelling (%)	Yield (Kg/rai)	Ear damaged rating scale (1-9)	Ear damaged (%)
	30 DAE	60 DAE				
Foliar spraying on maize at 7 and 14 DAE	64	192 abc	80.98 ab	1,512 a	1.12	11.22
Foliar spraying on maize at 7, 14 and 35 DAE	64	190 abcd	80.19 ab	1,467 a	1.09	10.94
Foliar spraying on maize at 14 and 35 DAE	62	195 ab	81.00 ab	1,387 ab	1.10	11.03
Foliar spraying on maize at 14, 21 and 35 DAE	56	194 abc	80.83 ab	1,418 ab	1.06	10.61
Foliar spraying on maize at 7, 14, 21 and 35 DAE	63	197 a	80.36 ab	1,441 a	1.15	11.55
Seed treatment	53	184 bcd	81.41 ab	1,238 ab	1.07	10.67
Seed treatment and foliar spraying on maize at 35 DAE	55	183 cd	82.54 a	1,233 ab	1.13	11.27
Seed treatment and foliar spraying on maize at 21 and 35 DAE	59	197 a	79.69 b	1,518 a	1.08	10.84
Seed treatment and foliar spraying on maize at 14, and 21 35 DAE	62	200 a	79.93 b	1,425 ab	1.16	11.62
Untreated control	53	180 d	82.44 a	1,140 b	1.11	11.08
Mean	59	191	80.94	1,378	1.11	11.08
F-test	ns	**	**	**	ns	ns
C.V. (%)	7.93	2.05	1.05	7.22	3.46	3.58

DAE=Days after emergence of the plants

Means followed by the same letter within a column are not significantly different at 5% level of probability using Duncan Multiple Range Test (DMRT)

* Significant at 5% level of probability

** Significant at 1% level of probability

^{ns} Not significant

Table 6 Mean of yield, total cost, total income, net income and benefit-cost ratio (BCR) on maize at Nakhon Sawan Field Crops Research Center. (Late rainy season: 2023)

Treatments	Yield (Kg/rai)	Total cost (baht/rai)	Total income (baht/rai)	Net income (baht/rai)	benefit-cost ratio (BCR)
Foliar spraying on maize at 7 and 14 DAE	1,512	4,000	13,804	9,804	3.45
Foliar spraying on maize at 7, 14 and 35 DAE	1,467	4,403	13,393	8,990	3.04
Foliar spraying on maize at 14 and 35 DAE	1,387	4,000	12,663	8,663	3.17
Foliar spraying on maize at 14, 21 and 35 DAE	1,418	4,403	12,946	8,543	2.94
Foliar spraying on maize at 7, 14, 21 and 35 DAE	1,441	4,806	13,156	8,350	2.74
Seed treatment	1,238	3,320	11,302	7,982	3.40
Seed treatment and foliar spraying on maize at 35 DAE	1,233	3,724	11,257	7,533	3.02
Seed treatment and foliar spraying on maize at 21 and 35 DAE	1,518	4,126	13,859	9,733	3.36
Seed treatment and foliar spraying on maize at 14, and 21 35 DAE	1,425	4,529	13,010	8,481	2.87
Untreated control	1,140	3,194	10,408	7,214	3.26
Mean	1,378	4,051	12,580	8,530	3.00