นวตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

Innovation of Seamless Technology for effective and sustainable control of Phytoplasma caused sugarcane diseases

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วีรกรณ์ แสงไสย์ เบญจวรรณ รัตวัต จุฑามาศ สอนเมือง ชมัยพร ไกยฝ่าย วสันต์ สิงห์คำ วิทยา ศรีภักดี กัญญ์ชิตา เคนเหลื่อม รวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์

Suchirat Sakuanrungsirikul, Weerakorn Sangsai, Benjawan Rattawat, Jutamas Sonmuang, Chamaiporn Kaiyaphai, Wasan Singkham, Wittaya Sripukdee, Ganchita Kenleum, Raweewan Chuekittisak

บทคัดย่อ

โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่สำคัญ มี 3 โรค ได้แก่ โรคใบขาว โรคใบขาวกอฝอย ที่มักถูกเรียกรวมกันว่า โรคใบขาว และโรคกอตะไคร้ เป็นโรคติดต่อร้ายแรงที่เป็นปัญหาต่อการผลิตอ้อยของไทยมาอย่างยาวนาน มีการติดเชื้อทางท่อนพันธุ์และมีเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ โดยมีปัจจัยหลัก 2 ประการที่เกี่ยวข้องแต่ยังมีปัญหาทำให้การจัดการไม่ประสบผลสำเร็จอย่างยั่งยืน ประการแรกคือ ขาดท่อนพันธุ์สะอาดในการปลูก ทำให้ยังมีต้นติดเชื้อวนเวียนอยู่ในแปลง แม้มีต้นปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแต่ปริมาณน้อยไม่เพียงพอ ทั้งยังขาดการควบคุมคุณภาพ ทำให้มีต้นที่ได้ไม่ปลอดเชื้อและแสดงอาการในแปลง ไม่มีการตรวจคัดกรองแปลงแม่พันธุ์จากปัญหาค่าตรวจแพง ไม่คุ้มค่าใช้จ่าย รวมไปถึงวิธีการตรวจมีความยุ่งยาก ใช้ต้นทุนสูง ต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือพร้อมและผู้ใช้ที่ชำนาญเฉพาะด้าน ทำให้ขาดหน่วยตรวจคัดกรองท่อนพันธุ์ ส่วนประการที่สอง คือ ขาดการควบคุมความรุนแรงและการแพร่ระบาดของโรคในสภาพไร่ เนื่องจากขาดการสุ่มตรวจในแปลงเพื่อการควบคุม กำจัด สาเหตุจากขาดแนวทางในการจัดการ รวมไปถึงขาดวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจคัดกรอง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่ต่อเนื่องเพื่อการจัดการและควบคุมโรคนี้ทั้งระบบ ตั้งแต่ควบคุมคุณภาพการผลิตอ้อยปลอดเชื้อจากห้องปฏิบัติการในระดับต้นน้ำ แปลงแม่พันธุ์ในระดับกลางน้ำ ไปจนถึงแปลงปลูกในระดับปลายน้ำ โดยพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโรคที่ตอบโจทย์การใช้งานในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับแปลง รวมทั้งเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดกรองระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่การผลิตต้นปลอดเชื้อไปจนถึงการควบคุมความรุนแรงของโรคในสภาพไร่ จากผลการทดลองที่นำเสนอนี้ ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจคัดกรองโรคใหม่ 3 วิธีการ ที่เหมาะต่อการใช้งานตามวัตถุประสงค์และสภาพการใช้งาน เทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้งานในหน่วยที่ไม่มีห้องปฏิบัติการ ใช้เครื่องมือจำนวนน้อย ง่าย ประหยัด รวดเร็ว และดูผลได้ด้วยตาเปล่า ใช้ในการตรวจคัดกรองแปลงแม่พันธุ์และในสภาพไร่ได้ เทคนิค M13-tagged two-steps-PCR และเทคนิคการตรวจยีน Immunodominant protein (IMP) ของเชื้อถูกพัฒนาเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ

ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น 180 ถนนมิตรภาพ ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

Khon Kaen Field Crops Research Center, 180 Mitraphap RD., Sila, Muang, Khon Kaen.

ที่มีเครื่องมือชีวโมเลกุลพื้นฐาน และต้องการผลที่มีความละเอียดสูงขึ้น เพื่อทดแทนวิธีเดิมที่มีปัญหา โดยเทคนิคแรกนั้นเป็นการพัฒนาขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบใหม่ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ซึ่งยังไม่มีการรายงานมาก่อน มีความไวใกล้เคียงกับวิธีการเดิมแต่ใช้เวลาตรวจและค่าใช้จ่ายลดลงเท่าตัว ใช้ในการคัดกรองต้นปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการสุ่มตรวจในแปลงได้ ส่วนเทคนิคที่สองถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแก้ปัญหาความไม่จำเพาะต่อเชื้อในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อด้วยวิธี qPCR เดิม และเป็นรายงานแรกที่สามารถตรวจสอบยีน IMP ในเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยได้ เทคนิคการตรวจเชื้อแบบใหม่ทั้ง 3 วิธีการนี้ มีความจำพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยสูง มีความไวสูง โดยตรวจเชื้อปริมาณน้อยได้ถึง 0.1-0.01 copy/µl ใช้เวลาตรวจตั้งแต่ 2 ชั่วโมง ไปจนถึง 2 วัน รวดเร็วกว่าวิธีเดิม มีค่าตรวจประมาณ 90-200 บาทต่อตัวอย่าง สามารถรวมตัวอย่างตรวจได้ 2-5 ตัวอย่างต่อหลอด ในการควบคุมคุณภาพการผลิตอ้อยปลอดเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าต้องเพิ่มขั้นตอนการตรวจเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งการขยายในรุ่นที่ 2 ไป 3 เพื่อลดความเสี่ยงในการขยายเพิ่มปริมาณต้นที่มีเชื้อสูง และไม่ควรขยายพันธุ์เกิน 3 -4 รุ่น โดยต้นที่ได้ในรุ่นที่ 5 มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ ผลจากการศึกษานี้ทำให้สามารถกำหนดเกณฑ์ในการควบคุมโรคให้ได้ทั้งระบบ โดยในระดับแปลงต้นแม่พันธุ์ควรมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำกว่า 1 copy/µl ส่วนในระดับแปลงปลูกทั่วไปควรอยู่ในช่วง 1-10 copy/µl จึงจะสามารถยับยั้งความเสียหายต่อผลผลิตและไว้ตอได้นานขึ้น รายงานนี้เป็นครั้งแรกที่มีการกำหนดเกณฑ์ในการควบคุมและจัดระดับความรุนแรงของโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาได้ เทคโนโลยีที่พัฒนาดังกล่าวนี้ สามารถนำไปใช้ในการกำหนดมาตรฐานในการผลิตพันธุ์อ้อยเพื่อการขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและผู้ขายพันธุ์อ้อยได้ รวมทั้งสามารถใช้ในการสุ่มตรวจแปลงเพื่อติดตามเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรค สามารถควบคุมระดับปริมาณเชื้อในแปลงให้อยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้การควบคุมโรคนี้ประสบความสำเร็จอย่างยั่งยืนได้ ทำให้ไว้ตอได้นานขึ้น ลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร และเพิ่มศักยภาพการแข่งขันให้กับอุตสาหกรรมอ้อยไทยได้อย่างยั่งยืน

คำหลัก: โรคอ้อย, M13-tagged two step PCR, IMP, LAMP, ระดับความรุนแรงของโรค

ABSTRACT

The sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS), recognised as white leaf disease, and sugarcane green grassy shoot (SCGGS) are the three devastated diseases in sugarcane industry in Thailand for decades. These diseases are seed-borne and transmitted by the 2 leaf hoppers. Two major factors play important roles in the disease control, though, controlling is yet unsuccessful. The first factor is lacking of the clean seed canes that resulted in circulation of disease in the contaminated field. Despite disease-free seed canes is available but not enough to cover the affected areas. Lacking of quality control in the tissue culture production often result in contaminated seeds that expressed disease symptom in the field. Though highly sensitivity detection methods are available, but the cost and complication of the technology hinder their accessibility to the users which result in incomprehensive disease control and in improper timing. Secondly, lacking of epidemic control in the field due to

lacking of proper control measure and appropriate disease screening methods, results in consistently disease outbreak until present. This study aimed to develop seamless technology for effective and sustainable control of these sugarcane diseases from the upstream of producing clean seed canes in the laboratory and in the mother plant plots, to downstream of disease inoculum controlling in the field. In this presented paper, three new disease detecting methodologies were developed for laboratory and field applications, as well as disease severity ranking, to be used as screening threshold in the disease-free production lines through epidermic control in the field. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed as a simple technique for the detection unit at the field station. This technique requires few instruments with simple, fast manipulation time and low cost. The result can be visualised at the end-point, therefore it is suitable to be used for field screening. The M13 tagged two-steps PCR and the Immunodominant protein (IMP) detection techniques were developed to produce higher resolution results to be applied in the basic molecular biology laboratory to replace the problematic nested-PCR and qPCR. The first method was designed with new amplification schemes and new primer types for fast and highly sensitive amplification patterns compatible to nested PCR, but consumed half manipulation time and cost. This is the first report to develop this new scheme of phytoplasma detection. This method can be applied for screening of disease-free mother plant in tissue culture propagation process as well as field sampling. The later method, Imp-PCR, was developed to solve the nonspecific detection problem in the previous qPCR method and is the first report to detect IMP gene in sugarcane phytoplasma. These 3 new techniques revealed their high specificity to those sugarcane phytoplasmas with high sensitivity detection range of 0.1-0.01 copy/µl. The detection time ranged from 2 hours to 2 days, faster than the existing methods. The costs were in the range of 90-200 baht/sample. Pooling of 2-5 samples is recommended for field screening as per the detection sensitivity of the method. Quality control should be applied in the production process of disease-free plant by tissue culture. Additional disease screening is essential especially in subculture generation 2 to 3 to avoid multiplication of the contaminated population while subculturing is recommended at 3 to 4 generations. Stunting and weakening population were observed in subculture generation 5 that is not recommended for propagation to avoid genetic variation as well as high phytoplasma contamination population. To control disease outbreak in the field, phytoplasma severity ranking based on phytoplasma concentration in plant were determined in this study. It was found that the phytoplasma loads at less than 1 copy/µl is recommended for healthy mother plant plots

while 1-10 copy/µl is for disease control in the planting field. This is the first report to identify severity ranking to be applied as control measure for phytoplasma disease in sugarcane. These new methodologies presented in this report, can be used as standard protocols in sugarcane seed production as part of the seed trader registration, as well as for disease control in field. The application of this proposed methodologies will provide mean to prolong ratooning generation as well as effectively and sustainably phytoplasma disease control that result in reduction of production cost, increase profit and sustainable maximizing compatibility of Thai sugarcane industry.

Keywords: sugarcane disease, M13-tagged two step PCR, IMP, LAMP, disease severity ranking

คำนำ

โรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่สำคัญ มี 3 โรค ได้แก่ โรคใบขาว (sugarcane white leaf : SCWL) และ โรคใบขาวและกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) สองโรคนี้มักถูกเรียกรวมกันว่าโรคใบขาวเนื่องจากทำให้อ้อยมีอาการใบขาว และโรคกอตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGGS) ซึ่งไม่แสดงอาการใบขาวแต่มีลักษณะแตกกอฝอย ทั้งสามโรคนี้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่างกันสามชนิด (ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ, 2555) เชื้อไฟโตพลาสมาสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์และมีเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิดเป็นแมลงพาหะนำโรค (ยุพา หาญบุญทรง และคณะ, 2548) โรคนี้เป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตอ้อยของไทยอย่างเรื้อรังยาวนานนับตั้งแต่เริ่มมีการปลูกอ้อยในไทย สร้างความเสียหายให้กับผลผลิตอ้อยได้มากถึงร้อยเปอร์เซ็นต์ นับเป็นตัวแปรสำคัญตัวหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตอ้อยของไทยสูงขึ้น จากผลผลิตต่ำ ปลูกได้เพียง 1-2 ตอ ในอดีตที่ผ่านมาแม้มีรายงานถึงเชื้อสาเหตุของโรค วิธีการแพร่กระจาย (พรทิพย์ วงศ์แก้ว, 2542) แต่การจัดการยังไม่ประสบผลสำเร็จ ยังพบการแพร่ระบาดเป็นระยะๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งพื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรง ความรุนแรงของโรคขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และสภาพความอุดมสมบูรณ์ของดิน (กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ และคณะ, 2553) การแพร่ขยายโรคอย่างรวดเร็วมักพบหลังจากปีมีการขยายพื้นที่ปลูกจากราคาอ้อยที่จูงใจ และท่อนพันธุ์หาได้ยาก ทำให้เกษตรกรไม่คัดท่อนพันธุ์คุณภาพ

จากการศึกษาพบว่าความรุนแรงของอาการของโรคมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อ ระดับปริมาณเชื้อที่ทำให้อ้อยแสดงอาการใบขาวได้บางส่วน อยู่ที่ประมาณระดับ 10^3 copies/µl วิเคราะห์ด้วยยีน 16S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา ส่วนในต้นที่ติดเชื้อในระดับ 10^2 copies/µl จะยังไม่แสดงอาการ แต่เป็นระดับที่ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดในอ้อยที่จะทำให้แสดงอาการใบขาวได้ชั่วคราวหากมีการชักนำด้วยภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อม (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2558) ดังนั้นการตรวจเชื้อเพื่อประเมินความปลอดภัยของแปลงแม่พันธุ์ การใช้ต้นพันธุ์สะอาด แข็งแรง จึงเป็นข้อปฏิบัติสำคัญร่วมกับการจัดการแปลงให้เหมาะสม โดยพบว่าการใช้ต้นพันธุ์สะอาดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบต้นเป็นโรคใบขาวน้อยกว่า 1 % และสามารถไว้ตอได้อีก 3-4 ตอ (นิลุบล ทวีกุล, 2555) จากการสำรวจพบว่าเกษตรกรที่มีการจัดการแปลงที่ดี มีการผสมผสานระหว่างการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ร่วมกับการใช้ปุ๋ยเคมีอย่างเหมาะสม ดินมีความอุดมสมบูรณ์ของดิน สามารถลดผลกระทบจากสภาวะเครียดของพืชจากสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถไว้ตอได้ยาวนานได้มากกว่า 15 ตอ มีกอที่แสดงอาการ

โรคใบขาวน้อยมาก (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2562) และพบว่าการจัดการธาตุอาหารตามความต้องการของอ้อยที่เหมาะสมตามสภาพพื้นที่สามารถลดความรุนแรงของโรคใบขาวได้ (วันทนา และคณะ, 2564) ดังนั้นในการจัดการโรคใบขาวและโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาให้ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพอย่างยั่งยืนนั้น องค์ประกอบสำคัญจึงอยู่ที่ (1) การใช้ท่อนพันธุ์สะอาดที่มีสุขภาพดี ร่วมกับ (2) การจัดการแปลงให้มีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และ (3) การควบคุมระดับปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในระดับแปลงหรือในสภาพไร่ทั้งระบบให้อยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต จะสร้างความยั่งยืนในการควบคุมโรคได้อย่างแท้จริง

ในการขยายท่อนพันธุ์สะอาดจากแปลงแม่พันธุ์ที่คัดแล้วว่าไม่แสดงอาการโรค เกือบทั้งหมดไม่มีการสุ่มตรวจเชื้อในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากวิธีการที่ใช้ตรวจโรคในปัจจุบันยังมีราคาสูง และไม่มีหน่วยรับตรวจทั่วไป จึงทำให้เชื้อโรคเหล่านี้ยังวนเวียนอยู่ในไร่อ้อย ซึ่งในภาคอีสานที่เป็นแหล่งปลูกอ้อยใหญ่ของไทย โอกาสที่จะสุ่มตรวจพบเชื้อในระดับปริมาณที่สร้างความเสียหายต่อผลผลิตได้ มีโอกาสสูงกว่าในภาคกลางและภาคตะวันตก (Khumla, et al., 2021) ดังนั้นการควบคุมการระบาดของโรคหรือปริมาณการติดเชื้อให้อยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต จึงเป็นแนวทางในการจัดการที่ยั่งยืน และใช้ได้จริง แต่ก็ยังขาดเกณฑ์ระดับปริมาณเชื้อที่ใช้เพื่อการควบคุมการแพร่ระบาด การใช้ต้นพันธุ์ปลอดเชื้อจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นวิธีที่นิยมนำมาแก้ปัญหา แต่มีปริมาณน้อย ไม่สามารถครอบคลุมพื้นที่การระบาดได้ในภาพรวมของประเทศ รวมทั้งยังพบว่าการผลิตอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นการแพร่กระจายต้นที่ติดเชื้อได้อีกทางหนึ่ง หากการคัดกรองโรคไม่ทั่วถึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการขยายพันธุ์ด้วยระบบที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น ระบบไบโอรีแอคเตอร์ ที่ขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และปริมาณมาก โดยมีรายงานว่าอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ขยายสู่เกษตรกร มีการแสดงอาการใบขาวเมื่อลงปลูกในแปลงหลายแหล่ง ทำให้เกษตรกรขาดความเชื่อมั่นในเทคโนโลยีนี้

การตรวจคัดกรองโรคจึงนับเป็นกิจกรรมหลักที่สำคัญในระดับต้นทางเพื่อการได้มาซึ่งอ้อยสะอาดสุขภาพดี ในปัจจุบันมีแม้มีการพัฒนาวิธีการตรวจที่มีความแม่นยำสูง และมีความไวสูง แต่การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคยังคงขาดประสิทธิภาพ จากการตรวจคัดกรองโรคที่ไม่ทั่วถึง หน่วยตรวจคัดกรองโรคมีจำนวนจำกัด สาเหตุมาจากวิธีการที่ใช้ต้องใช้ห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือราคาแพง ค่าตรวจต่อตัวอย่างมีราคาสูง โดยวิธีที่นิยมใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไปนิยมใช้เทคนิค nested-PCR เนื่องจากมีความไวสูง สามารถตรวจเชื้อในปริมาณต่ำมากได้ โดยใช้ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA และ secA (Bertaccini et al.2014, Sakuanrungsirikul et al, 2013) แต่มีค่าตรวจต่อตัวอย่างอยู่ระหว่าง 500-1500 บาท มีระยะเวลาในการตรวจ 3-5 วัน แต่มักพบผลบวกปลอมจากการติดเชื้ออื่น เช่นเดียวกันกับการตรวจหาปริมาณเชื้อด้วย Realtime PCR แม้จะให้ผลได้ในเวลา 1 วัน มีราคาค่าตรวจอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน ดังนั้นวิธีการที่ใช้ตรวจคัดกรอง จึงควรพัฒนาขึ้นเพื่อ 2 วัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อการตรวจคัดกรองอย่างละเอียดสำหรับการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเพื่อการสุ่มตรวจในแปลงปลูกเพื่อการคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์ และการควบคุมการแพร่ระบาด

การควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอย่างมีประสิทธิภาพ ยั่งยืน และควบคุมได้ทั้งระบบ จำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีที่ครบวงจร ที่ใช้ในสภาพไร่และระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะทำให้ควบคุมได้

ตั้งแต่ต้นทางการผลิตแม่พันธุ์อ้อยสะอาด และการควบคุมไม่ให้เกิดการแพร่ระบาดรุนแรงในระดับแปลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่ต่อเนื่องเพื่อการจัดการและควบคุมโรคนี้ทั้งระบบ โดยพัฒนาวิธีการตรวจคัดกรองโรคที่ตอบโจทย์การใช้งานในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับแปลง รวมทั้งเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดกรองระดับความรุนแรงของโรคตั้งแต่การผลิตต้นปลอดเชื้อไปจนถึงการควบคุมความรุนแรงของโรคในสภาพไร่ เทคโนโลยีที่พัฒนาดังกล่าวนี้ สามารถนำไปใช้ในการกำหนดมาตรฐานในการผลิตพันธุ์อ้อยเพื่อการขึ้นทะเบียนผู้ผลิตและผู้ขายพันธุ์อ้อยได้ เพื่อให้ได้ท่อนพันธุ์สะอาดเพียงพอต่อการใช้ทั้งประเทศ สามารถควบคุมระดับปริมาณเชื้อในแปลงให้อยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้การควบคุมโรคนี้ประสบความสำเร็จอย่างยั่งยืนได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช: ตัวอย่างใบสดจากอ้อยที่แสดงอาการใบขาว ใบขาวกอฝอย และกอตะไคร้ ที่สำรวจได้จากแหล่งระบาดของโรค ตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อในตัวอย่างแต่ละอาการด้วยการตรวจลำดับนิวคลิโอไทด์ตำแหน่ง 16S (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

การตรวจเชื้อและวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา :

การตรวจด้วยวิธี Nested-PCR และ Realtime PCR ทำตามวธีการของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558)

การตรวจด้วยวิธี loop-mediated isothermal amplification (LAMP) LAMP : ออกแบบไพรเมอร์จากเชื้อ SCWL molecular chaperonin *gro*EL gene จำนวน 3 คู่สาย (F3: GCAATTGATGCAGGAGCT; B3: CATTAATAACTCCATCCTTACCT; FIP: TCTTGGGCGTCTACTTTTTTAGATT-TAGTAAAAGAAGGAATTGAGTTAGC; BIP: ATTCAAAATGTGGCTTCTGTTTCAT-ACTTTTTGCATCGCTTGG; LoopF: TCTTGGGCGTCTACTTTTTTAGATT; LoopR : ATTCAAAATGTGGCTTCTGTTTCAT) ใช้น้ำยาสำเร็จรูป LavaLamp DNA Master Mix (Lucigen) ในปริมาตรรวม 24 µl ประกอบด้วย DNA 75 ng, 1X LavaLamp DNA Master Mix, 0.1X Green Fluorescent Dye, 0.2 µM outer primer (F3, B3), 1.6 µM inner primer (FIP, BIP), 0.4 µM loop primer (Loop F and R) บ่มที่ 65°C/60 นาที ทำปฏิกิริยาและอ่านผลด้วยเครื่อง Thermostatic Color Sensor “MyAbscope” (Kaneka Cooperation, Japan) ผลบวก คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 630 nm มีค่าสูงกว่า negative control

วิธี M13-tagged two-steps PCR : ออกแบบไพรเมอร์ M13 เชื่อมไพร์เมอร์ MLO-X/Y (1 F: CACATTGGGACTGAGACACGG, N1R: TACTCATCGTTTACGGCGTGGACT จับกับ M13 AACAGCTATGACCATGCGAG CAAC + N2F: GCGTGAATGACGAAGTACTTCG, N2R: TACGCACCCTTTACGCCCAAT) ในปริมาตรรวม 15 µl ประกอบด้วย DNA 75 ng, 1x PCR buffer A, 0.2 µM dNTP, 0.1u Taq DNA polymerase (Vivantis), 0.5 µM primer กำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังนี้ 1) 95°C/3 นาที 2) 95°C/30 วินาที, 60°C/30 วินาที, 72°C/1.30 นาที ทำซ้ำ15 รอบ 3) 95°C/30 วินาที, 62°C/40 วินาที, 72°C/1.30 นาที ซ้ำ 20 รอบ 4) 72°C/5 นาที และ 25°C/5 นาที ตรวจผลด้วย Electrophoresis

วิธี IMP-PCR : ออกแบบไพร์เมอร์ Imp (IMP-F: GGTAAAATAGCTATTATTACAT; IMP-R: ATGTTTCA ATTGTTGCGTCTTTT) ในปริมาตรรวม 15 µl ประกอบด้วย 1x PCR buffer A, 0.2 µM dNTP, 0.1u Taq

DNA polymerase (Vivantis) , 0.5 µM primer กำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังนี้ 1) 95°C/3 นาที 2) 95°C/30 วินาที, 55°C/40 วินาที, 72°C/1.30 นาที ซ้ำ 35 รอบ 3) 72°C/5 นาที และ 25°C/5 นาที ตรวจผลด้วย Electrophoresis และ Realtime PCR

การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : ใช้อ้อยที่ได้จากการเพาะขยายด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากศูนย์ขยายพันธุ์พืชอุดรธานีพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3) ในอาหารกึ่งแข็ง กึ่งเหลวสูตร MS ที่เติม BA 2 mg/L และ Citric 170 mg/L ทำการขยายต่อดังนี้ (1) ขยายเพิ่มปริมาณครั้งที่ 1 จำนวน 10 ตัวอย่าง (line 1-10) เพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ แล้วแบ่งแต่ละตัวอย่างนำไปตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา นำ line 1-10 ขยายต่อในรุ่นที่ 2-7 จำนวน line ละ 5 ซ้ำ เลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์ต่อรุ่น แบ่งตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 10 line รวม 50 ตัวอย่าง ด้วยวิธี nested-PCR และ Realtime PCR ตามวิธีการของ ศุจิรัตน์และคณะ (2558) และ IMP gene

การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่ปลูกในสภาพแปลง : คัดเลือกต้นอ้อยในแปลงทดลองใน ศวร.ขก. ประมาณ 50 กอที่มีอาการและไม่มีอาการใบขาว ติดเครื่องหมายทุกลำ บันทึกอาการสีใบ เก็บใบตรวจปริมาณเชื้อใบขาวด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ ศุจิรัตน์และคณะ (2558) ที่อายุ 3, 6 และ 9 เดือน

การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาวระดับต่างๆ : สำรวจตัวอย่างกออ้อยที่มีอาการใบขาว บันทึกลักษณะการแสดงอาการใบขาว และอาการสีใบ ทำการตรวจวิคราะห์ตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ ศุจิรัตน์และคณะ (2558) และ IMP gene

ผลการทดลองและวิจารณ์

การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อการสุ่มตรวจในสภาพไร่:

1) **เทคนิค LAMP** : เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในอุณหภูมิเดียวต่างจากเทคนิค PCR ทำให้เครื่องมือที่ใช้มีราคาที่ถูกกว่ามาก ใช้การเรืองแสงหรือใช้ความขุ่นเป็นสิ่งบ่งบอกการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ดูผลด้วยตาเปล่าได้ ใช้ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว และให้ผลผลิตของปฏิกิริยามากกว่าวิธี PCR จึงมีความไวมากกว่า (Tomlinson et al., 2010) ทั้งยังมีน้ำยาสำเร็จรูปจำหน่ายทั่วไป ในราคาประหยัดประมาณ 90-150 บาทต่อตัวอย่าง มีการพัฒนาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจโรคหลายชนิด รวมทั้งในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชอื่น (Sugawara et al., 2012) ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ให้เหมาะสำหรับการตรวจเชื้อ SCWL, SCGS และ SCGGS ของอ้อย โดยใช้ยีนเป้าหมาย *gro*EL พบว่าวิธีการที่ได้มีความไวสูงกว่าวิธี PCR ถึง 1000 เท่า สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ในระดับที่น้อยกว่า 0.1 copy/µl (Table 1) ซึ่งเทียบเท่ากับการตรวจด้วย nested-PCR ข้อดีของ LAMP คือ ใช้งานง่าย และไม่มีผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนเมื่อเทียบกับวิธี nested-PCR ใช้เพียงเครื่องตรวจวัดการเรืองแสง หรือเครื่องบ่ม และอุปกรณ์ดูดจ่ายสารเท่านั้น ใช้เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเพียง 1 ชั่วโมง ใช้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์น้อยกว่าเนื่องจากเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพสูงกว่า จึงใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอได้ เมื่อเทียบกับวิธีการเดิมที่ต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าจึงต้องใช้เครื่องมือจำนวนมากกว่า วิธี LAMP สามารถใช้ได้โดยไม่ต้องมีห้องปฏิบัติการ ความเข้มข้นของเชื้อต่ำสุดที่ตรวจได้นั้นจัดเป็นระดับสีเขียว ที่จัดว่าอยู่ในปลอดภัยในระดับแปลงขยายพันธุ์ (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2562) ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นวิธีในตรวจคัดกรองแปลงแม่พันธุ์หรือใน

แปลงปลูกได้ ทั้งนี้วิธีนี้ไม่แนะนำสำหรับการใช้ตรวจคัดกรองเพื่อการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ต้องการผลตรวจที่มีความละเอียดมากขึ้น

Table 1. Comparison of detection sensitivity between LAMP targeting *gro*EL gene and nested-PCR targeting 16S-23S rDNA of SCWL phytoplasma. Sugarcane infected with SCWL was used as testing DNA.

Plant DNA dilution	LAMP DNA	Nested PCR (DNA)		Nested PCR (pUC1318-700 bp)		Concentration of pUC1318-700 bp (copy/μl)*
		700 bp	210 bp	700 bp	210 bp	
10^{0}	+	+	+	+	+	4.09×10^{9}
10^{-1}	NT	+	+	+	+	9.75×10^{8}
10^{-2}	+	+	+	+	+	9.75×10^{7}
10^{-3}	NT	+	+	+	+	8.90×10^{6}
10^{-4}	+	+	+	+	+	7.46×10^{5}
10^{-5}	NT	+	+	+	+	6.22×10^{4}
10^{-6}	+	+	+	+	+	1.68×10^{3}
10^{-7}	+	+	+	+	+	2.66×10^{2}
10^{-8}	+	-	+	-	+	4.11×10^{1}
10^{-9}	NT	-	+	-	+	9.55×10^{0}
10^{-10}	+	-	+	-	+	1.27×10^{-1}

NT: not tested + : positive - : negative * Copy number = (amount (ng)* 6.022x1023) / (length (bp) * 1x109* 650) .

2) เทคนิค M13 tagged two-steps PCR : เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มความไวของวิธี PCR ให้ได้ใกล้เคียงกับวิธี nested-PCR เพื่อร่นเวลาตรวจจาก 3-5 วันให้เหลือ 1-2 วัน และลดค่าตรวจลงครึ่งหนึ่งจากการใช้ PCR เพียงชุดเดียว โดยทำให้ค่าตรวจลดลงเหลือประมาณ 150-200 บาทต่อตัวอย่างจาก 500-1500 บาทต่อตัวอย่าง โดยออกแบบเครื่องหมายโมเลกุลแบบใหม่ที่มีเป้าหมายที่ยีน 16s-23s rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา และพัฒนาขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบใหม่ที่ทำให้ได้ผลผลิต PCR มากขึ้นในการทำ PCR เพียงครั้งเดียว มีผลผลิต PCR 2 ตำแหน่ง คือ 485 bp และ 262 bp พบว่าเป็นวิธีที่มีความไวสูงเทียบเท่าวิธี nested-PCR โดยตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อได้ต่ำสุดที่ 0.01 copy/μl แต่วิธีใหม่นี้สามารถใช้ดีเอ็นเอพืชที่เจือจางได้ต่ำสุดที่ 7 ระดับ (25×10^{-7}ng/μl) ส่วน nested-PCR สามารถใช้ดีเอ็นเอพืชที่เจือจางได้มากกว่า 14 ระดับ เนื่องจากมีการใช้ปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง (Table 2)

ปัญหาของวิธี nested-PCR คือความไม่จำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ ทำให้เกิดปัญหาแถบดีเอ็นเอรบกวนจากเชื้ออื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อน ทำให้แปลผลยาก พบว่าวิธีใหม่ที่ได้นี้สามารถแสดงตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมายที่ชัดเจน ไม่พบดีเอ็นเอรบกวนจากตำแหน่งอื่น ทำให้แปลผลได้อย่างชัดเจน มีความไวในการตรวจเชื้อเป้าหมายได้เทียบเท่ากับวิธี nested-PCR แต่ใช้เวลาในการตรวจที่เร็วกว่า มีความแม่นยำสูงกว่า และราคาประหยัดกว่าวิธีการเดิมเท่าตัว เหมาะกับหน่วยตรวจที่มีห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือชีวโมเลกุลพื้นฐาน และต้องการผลที่มีความละเอียดสูงขึ้น สามารถใช้เป็นวิธีในการสุ่มตรวจตัวอย่างในแปลงแบบรวมหลายตัวอย่างได้สูงถึง 7 ตัวอย่าง ทำให้สามารถลดค่าตรวจลงได้อีก รวมทั้งสามารถใช้ในการ

ตรวจคัดกรองเชื้อในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ โดยมีความไวในการตรวจเชื้อเป้าหมายสูงกว่าวิธี LAMP อีกถึง 10 เท่า

Table 2. Detection sensitivity of M13 tagged two-steps PCR against nested-PCR targeting 16S-23S rDNA of SCWL phytoplasma. Sugarcane infected with SCWL was used as testing DNA and PCR products were visualised by agarose gel electrophoresis.

SCWL infected sugarcane DNA serial dilution (25 ng/µl)	Concentration of SCWL 16s-23s rDNA copy number *	M13 tagged two- steps PCR (SCWL - DNA)		Nested PCR (SCWL - DNA)	
		485 bp	262 bp	700 bp	210 bp
10^{0}	$6.45X10^{5}$	+	+	+	+
10^{-1}	$5.68X10^{4}$	+	+	+	+
10^{-2}	$4.66X10^{3}$	+	+	+	+
10^{-3}	$2.31X10^{2}$	+	+	+	+
10^{-4}	$1.05X10^{1}$	-	+	-	+
10^{-5}	$1.44X10^{0}$	-	+	-	+
10^{-6}	5.80E-2	-	+	-	+
10^{-7}	3.30E-1	-	+	-	+
10^{-8}	5.27E-1	-	-	-	+
10^{-9}	7.03E-1	-	-	-	+
10^{-10}	9.77E-1	-	-	-	+
10^{-11}	8.41E-1	-	-	-	+
10^{-12}	8.71E-1	-	-	-	+
10^{-13}	2.10E-2	-	-	-	+
10^{-14}	5.10E-2	-	-	-	+

*Estimated by real time PCR E: extrapolated value **Detected by

3) เทคนิคการตรวจยีน IMP : เป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจปริมาณเชื้อด้วย Realtime PCR ทดแทนการตรวจยีน 16s-23s rDNA ขนาด 700 bp ที่ไม่จำเพาะต่อเชื้อ ทำให้เกิดความผิดพลาดสูงในการประมวลผลของเครื่อง ซึ่งผู้ใช้ต้องวิเคราะห์หาตำแหน่งที่แท้จริง ทำให้เกิดความล่าช้า รวมทั้งเกิดปัญหาการตัดสินค่าเบี่ยงเบนของค่า Tm อีก ในการทดลองนี้ได้พัฒนาไพร์เมอร์ตรวจจับยีน IMP ของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีนนี้ในพืชอื่น (Kakizawa et al., 2009) มาทำการพัฒนาออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ ให้สามารถตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมา 3 ชนิดในอ้อย ได้แก่ SCWL, SCGS, SCGGS และพัฒนาปรับขนาดผลผลิตให้เป็น 262 bp ที่เหมาะสมต่อการตรวจวิเคราะห์ด้วย Realtime PCR โดยยีนเป้าหมายมีค่า Melting temperature (Tm) ที่ 75.76°C และมีช่วงค่าที่ยอมรับได้ในการวิเคราะห์ปริมาณ IMP ระหว่าง 10-10^{10}copies/µl (Fig.2) โดยหากเชื้อต่ำกว่านี้เครื่องจะใช้วิธีการคำนวณค่าประมาณจากกราฟมาตรฐาน (Extrapolated value)

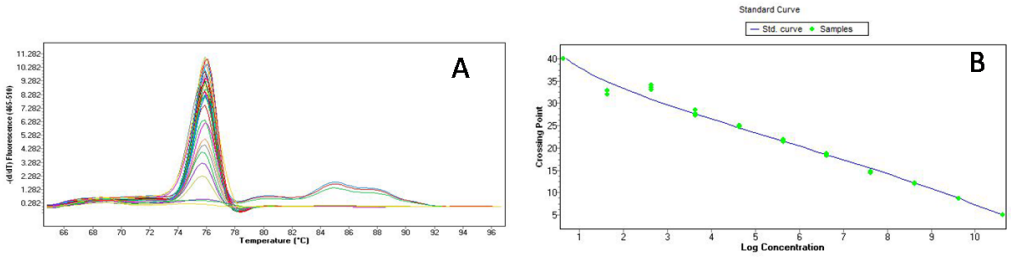

Figure 2. Melting peak (Tm) (A) and standard curve (B) of dilution plasmid pTG19-T containing 262 bp fragment of the IMP gene.

ผลการตรวจความถูกต้องและความแม่นยำของไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ของยีน IMP ที่พัฒนาได้งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยได้ดี เมื่อเทียบกับไพร์เมอร์จากชุดยีน 16s-23s rDNA จึงสามารถแก้ปัญหาความผิดพลาดในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายด้วยวิธี Realtime PCR ได้ รายงานนี้จึงเป็นรายงานแรกตรวจหายีน IMP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย และจะนำลำดับเบสของยีนที่ได้เข้าสู่ฐานข้อมูลสากลในลำดับต่อไป

การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคในสภาพไร่

ปริมาณเชื้อและอาการของต้น: จากการสำรวจตัวอย่างอ้อยที่มีอาการใบขาวระดับต่างๆ และทำการตรวจวิเคราะห์ระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยีน 16s-23s rDNA ด้วยชุดไพรเมอร์ MLO-X/MLO-Y ตำแหน่ง Tm ที่ตรงตามค่ามาตรฐาน (82-83°C) พบว่าตัวอย่างจากแปลงที่ไม่มีอาการใบขาว และมีสุขภาพดีมีค่าอยู่ในช่วง 10^0-10^2 copies/µl ในตัวอย่างใบเขียวจากต้นที่มีอาการใบขาว หรือกลุ่มอาการแฝง และกลุ่มตัวอย่างที่เริ่มแสดงอาการใบขาว มีปริมาณเชื้อตั้งแต่ระดับ 10^3 copies/µl ขึ้นไป (Table 3) สอดคล้องกับรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558) และจากการสำรวจตัวอย่างอีกมากกว่า 1000 ตัวอย่าง จากอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแหล่งปลูกหลายแหล่งในภาคกลางและอีสาน ทั้งในอ้อยปลูกและอ้อยตอ ให้ผลสอดคล้องกัน (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งแสดงถึงระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต (Tolerant threshold) และไม่แสดงอาการในสภาพไร่

Table 3: Phytoplasma concentration in sugarcane leaf samples with different degree of disease symptom

Sample source (leaf)	Sample size	Copy number of 700 bp of copy/µl In 25 ng plant DNA	
		Minimum	Maximum
Leaf from healthy plant	290	3.58	546.33
Green leaf from plant with white leaf symptom	51	1,433.33	52,766.67
Leaf with partial white symptom	45	7,433.33	8,276,666.66
Leaf with 50% white symptom	40	9,300.00	10,176,666.67
Leaf with 100% white symptom	30	1,286.67	8,776,666.67

การกำหนดเกณฑ์ปริมาณเชื้อและระดับในการคัดกรอง : จากรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2562) ที่ตรวจวิเคราะห์ระดับปริมาณเชื้อโรคใบขาวและการแสดงอาการของโรค และจัดทำเป็นแผ่นรายงานผลรุ่นใหม่ระดับความรุนแรงของโรคเป็นรหัสสีที่เข้าใจง่าย พร้อมคำแนะนำและการพยากรณ์โรคในแผ่น

รายงานรุ่นใหม่นี้ นับเป็นรายงานแรกที่มีการพัฒนาแผ่นรายงานผลการตรวจโรคไฟโตพลาสมาในอ้อยดังกล่าวขึ้นนั้น ในการศึกษาดังกล่าวพบว่าตัวอย่างอ้อยที่มีปริมาณเชื้อโรคใบขาวระดับ 10^2 copies/µl จัดเป็นระดับวิกฤตต่ำที่สุด ที่จะแสดงอาการใบขาวได้ชั่วคราวหากได้รับสภาวะเครียดจากการขาดน้ำและความร้อน ในขณะที่กลุ่มที่มีเชื้ออยู่ในระดับช่วง 1-10 copies/µl ไม่แสดงอาการใบขาว แต่จะมีบางต้นมีหน่อขาวได้ในรุ่นต่อมาต่อมา จึงจัดเป็นระดับเฝ้าระวัง ส่วนกลุ่มที่มีเชื้อน้อยกว่า 1 copy/µl ไม่พบหน่อขาวทั้งในรุ่นแรกและรุ่นหลัง จัดเป็นกลุ่มปลอดภัย และจากการศึกษาถ่ายทอดปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยสู่อ้อยตอและการแสดงอาการของโรคในสภาพไร่ พบว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นภายในต้นในระหว่างการเจริญเติบโต โดยพบการเพิ่มขึ้นจากระดับตั้งต้นหนึ่งระดับ โดยเริ่มในช่วงหน้าแล้ง และมีการเพิ่มมากขึ้นอีกหนึ่งระดับเมื่อเข้าสู่หน้าฝน (Fig. 3)

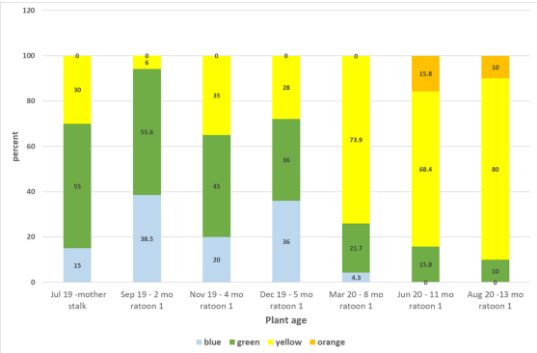

Figure 3. Percentage of sugarcane samples with different phytoplasma concentration collected from field in Khon Kaen Field Research Center during July 2019 to August 2020. Vertical bar represents samples collected in different month. Color represents phytoplasma concentration and severity ranking estimated by nested-PCR. Blue : <0.5; green: 0.5-1; yellow: 1-10; orange: 10-100 copies/µl in 25 ng plant DNA.

ดังนั้นปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับแปลงต้นแม่พันธุ์ควรอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำกว่า 1 copy/µl เพื่อให้เป็นระดับที่ปลอดภัยเมื่อนำไปขยายต่อในแปลง ส่วนในระดับแปลงปลูกทั่วไปที่ไม่ได้นำไปขยายต่อนั้น ควรอยู่ในช่วง 1-10 copy/µl จึงจะสามารถยับยั้งความเสียหายต่อผลผลิตและไว้ตอได้นานขึ้น และสามารถควบคุมโรคให้ได้ทั้งระบบอย่างยั่งยืน ในการสุ่มตรวจเพื่อประเมินผลการติดเชื้อในแปลงแม่พันธุ์ สามารถใช้วิธีการตรวจด้วย LAMP หรือ M13 tagged two-steps PCR และสามารถตรวจแบบรวมตัวอย่างเพื่อลดค่าใช้จ่ายลงตามที่แนะนำข้างต้น โดยจำนวนตัวอย่างที่สุ่มในกรณีที่ยอมรับความคลาดเคลื่อนที่ 10% จะสุ่มตัวอย่างที่ 70 ตัวอย่าง/ไร่ ได้ (Krejcie and Morgan, 1970)

การควบคุมคุณภาพอ้อยที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ:

ในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักพบว่าต้นที่ได้จำนวนหนึ่งแสดงอาการของโรคในไร่ แม้จะทำการตรวจคัดกรองโรค และคัดเฉพาะต้นแม่พันธุ์ที่ผ่านการตรวจเชื้อแล้วมาขยายพันธุ์ ทำให้เกษตรกรขาดความเชื่อมั่นในเทคโนโลยีการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และปฏิเสธไม่รับต้น หากมีประชากรต้นอ่อนที่มีเชื้ออยู่แล้วในปริมาณที่สูงในต้น จะแสดงอาการของโรคพร้อมกันในแปลงตั้งแต่ระยะอ้อยปลูก หรืออาจแสดงอาการในระยะอ้อยตอหากมีเพียงบางต้นที่มีเชื้อสูง ปัญหาเกิดจากขาดการควบคุมคุณภาพในการผลิตอ้อยปลอดโรค โดยส่วนใหญ่แล้วจะทำการตรวจเชื้อเพื่อคัดเลือกต้นจากแปลงที่จะนำมาใช้ในการขยายเท่านั้น ไม่มีการตรวจคัดกรองอีกในการขยายรุ่นถัดมา แต่จากผล

การศึกษาถึงการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แยกขยายด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในรุ่นต่างๆ ตั้งแต่รุ่นที่ 1-7 รุ่น พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อในภาพรวมสูงขึ้นเมื่อมีการขยายในรุ่นที่มากขึ้น (Table 4) แสดงให้เห็นว่ามีประชากรที่มีปริมาณเชื้อสูงเพิ่มขึ้นในแต่ละรุ่น

การตรวจสุ่มวิเคราะห์รายตัวอย่างพบว่าในรุ่นที่ 1 พบกลุ่มตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อสูงจำนวน 1 กลุ่ม ในขณะที่กลุ่มอื่นตรวจไม่พบเชื้อ แต่ตรวจพบเชื้อสูงมากขึ้นในเกือบทุกกลุ่มในรุ่นที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามการเจริญเติบโตของพืช สอดคล้องกับที่เกิดขึ้นในสภาพแปลง การขยายเพิ่มปริมาณในรุ่นที่ 3 ได้จากการคัดเลือกตัวอย่างที่ตรวจไม่พบเชื้อในรุ่นที่ 2 มาขยาย ดังนั้นจึงพบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อในรุ่นที่ 3 มีค่าต่ำกว่ารุ่นที่ 2 แต่จากการขยายเพิ่มในรุ่นที่ 4 พบว่าประชากรต้นอ่อนที่ได้เริ่มมีปริมาณเชื้อสะสมในต้นสูงขึ้น และโอกาสที่จะพบต้นปลอดเชื้อน้อยลง จนถึงรุ่นที่ 7 ตรวจพบเชื้อได้ในทุกกลุ่ม (Table 4) จากการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อในแต่ละตัวอย่างจะพบว่ามีความแปรปรวนสูงมาก สาเหตุเกิดจากการกระจายตัวของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้นอ้อยนั้นมีความไม่สม่ำเสมอ (Christensen et al, 2004) ในกลุ่มต้นมี่มีอาการแฝงที่มีปริมาณเชื้อในระดับต่ำ ทำให้การตรวจเชื้อขาดความแม่นยำ ทำให้เกิดการเล็ดรอดของต้นที่ติดเชื้อและเข้าสู่ขบวนการขยายเพิ่มปริมาณจำนวนต้น ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณภายในต้นตามการเจริญเติบโตของพืชด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำเป็นต้องคัดกรองต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อเพื่อการขยายรุ่นต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการขยายในรุ่นที่ 2 ไปรุ่นที่ 3 และควรจำกัดการขยายไม่เกิน 4 รุ่น นอกจากนี้ยังพบว่าประชากรในรุ่นที่ 5 มีการแสดงอาการต้นไม่สมบูรณ์ แคระแกร็น ไม่เหมาะต่อการขยายพันธุ์ต่อ

Table 4. Average phytoplasma concentration in sugarcane plantlets (KK3) analysed by Realtime -PCR of 16S-23S rDNA in 1st to 7th subcultures.

Group#/subculture	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*
#UT1	0.0	0.3	0.3	0.0	139.8	507.0	1.0
#UT2	0.0	540.0	0.0	0.0	1.3	415.7	26.4
#UT3	0.0	0.0	0.2	0.0	5.1	828.2	3281.0
#UT4	0.0	249.2	0.2	47.0	0.0	0.0	11237.5
#UT5	0.0	310.0	0.0	30.2	20.8	514.9	367.0
#UT6	0.0	9652.1	0.0	142.6	59.1	279.0	72.9
#UT7	0.0	1378.3	22.1	627.8	95.1	2004.5	5.4
#UT8	1194.0	12123.3	0.3	248.1	3.3	457.5	1044.4
#UT9	0.0	7040.0	0.0	545.4	7.7	183.3	2259.4
#UT10	0.0	27365.7	36.4	1377.7	1.1	283.5	11.7
average	119.4	5865.9	5.9	301.9	33.3	547.4	1830.7
SD	358.2	8347.7	12.1	419.9	46.4	529.5	3314.6
cv	300	142	203	139	139	97	181

* (copies/µl in 25 ng plant DNA)

สรุปผลการทดลอง

ในรายงานนี้ได้พัฒนาวิธีการใหม่ในการตรวจคัดกรองโรค ที่ตอบโจทย์การใช้งานทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับแปลง ประกอบด้วยวิธี LAMP ที่เป็นการตรวจแบบรวดเร็ว ใช้เครื่องมือจำนวนน้อย สามารถตรวจดูผลได้ด้วยตาเปล่า ในกรณีที่ไม่มีห้องปฏิบัติการ ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจได้ ที่ระดับ 0.1 copy/µl ใช้เวลาตรวจประมาณ 1 -2 ชั่วโมง ซึ่งเหมาะสำหรับการตรวจคัดกรองในระดับแปลง แต่ไม่แนะนำให้ใช้ในการคัดกรองเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากความไวอาจไม่เทียบเท่าวิธี nested-PCR วิธี M13 tagged two-step PCR เป็นการพัฒนาขึ้นสำหรับการใช้งานในหน่วยที่มีห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุลพื้นฐาน เพื่อให้ใช้งานได้ใกล้เคียงกับวิธี nested-PCR สามารถแก้ปัญหาการผลรบกวนที่เกิดจากการปนเปื้อนเชื้ออื่นในตัวอย่างพืช และปฏิกิริยาจบในครั้งเดียว ใน 1 วัน ใช้วัสดุสิ้นเปลืองลดลงครึ่งหนึ่งของวิธี nested-PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ทำให้อ่านผลง่ายกว่า ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจได้ ที่ระดับ 0.01 copy/µl ทำให้สามารถใช้ตรวจเพื่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยจากทั้ง 2 วิธีการนี้มีค่าใช้จ่ายในการตรวจที่ประมาณ 120-200 บาทต่อตัวอย่าง จากความไวของวิธีการ ทำให้สามารถรวมตัวอย่างในการตรวจได้เพื่อประหยัดค่าใช้จ่าย การรวมตัวอย่างไม่ควรเกิน 5 ตัวอย่างต่อหนึ่งการรวม 1 ครั้ง เพื่อให้ยังคงมีดีเอ็นเอพืชในปริมาณที่วิธีการสามารถตรวจจับได้ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ใช้ปฏิกิริยาครั้งเดียว โดยขนาดของกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ตรวจขึ้นกับระดับความเชื่อมั่นที่ต้องการ รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่มีการพัฒนาไพร์เมอร์แบบใหม่และขบวนการเพิ่มปริมาณแบบใหม่ที่เทียบเท่า nested-PCR ได้ แต่ประหยัด แม่นยำ และรวดร็วกว่าเท่าตัว อีกทั้งยังได้พัฒนาวิธีการใหม่ในการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย qPCR และเป็นรายงานแรกที่มีการตรวจจับยีน Imp ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย โดยลำดับเบสของยีนจะนำเข้าบันทึกในฐานข้อมูลสากล และจากการสำรวจตัวอย่างสามารถตรวจพบระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยที่ไม่ส่งผลเสียหายต่อผลผลิต และใช้เป็นค่า Tolerance threshold สำหรับการควบคุมการแพร่ระบาดแบบทั้งระบบ นอกจากนี้แล้วยังเป็นรายงานแรกที่สามารถกำหนดระดับความรุนแรงโรคอ้อยจากเชื้อไฟโตพลาสมาบนพื้นฐานของปริมาณเชื้อภายในต้น รวมสามารถกำหนดเกณฑ์ระดับปริมาณเชื้อเพื่อการคัดกรองในระดับแปลงแม่พันธุ์ และแปลงปลูก รวมไปถึงวิธีการในการควบคุมคุณภาพการผลิตอ้อยปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา เทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพการผลิตท่อนพันธุ์สะอาดในแปลงแม่พันธุ์ หากมีการขึ้นทะเบียนผู้ขายพันธุ์อ้อย และสำหรับโรงงานน้ำตาลที่ใช้ในการคัดกรองแปลงแม่พันธุ์จากกลุ่มเกษตรกรเครือข่าย รวมทั้งสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย และหน่วยงานอื่นที่เกี่ยวข้องในการติดตามสถานการณ์และควบคุมการแพร่ระบาดของโรคร้ายแรงนี้ในแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ ซึ่งจะทำให้ความรุนแรงของโรคลดลงไปได้อย่างต่อเนื่อง สามารถไว้ตอได้มากกว่า 2-3 ในแหล่งที่มีการระบาดรุนแรง ทำให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรลดลงได้อย่างยั่งยืน

การนำไปใช้ประโยชน์

ตีพิมพ์ เผยแพร่ ผลงาน ดังนี้ : (1) Thailand Research Expo : Symposium 2020 ภาคโปสเตอร์ ในงานมหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2563. กทม. (2) งานประชุมวิชาการนานาชาติ The International Sugar and Sugarcane Conference วันที่ 31 กรกฎาคม – 2 สิงหาคม 2562 ณ โรงแรม ดุสิตธานี พัทยา ชลบุรี (3) “ใน

งานประชุม “Second International Workshop on Network development and Information Sharing for the Management of Sugarcane White Leaf Disease in Asia” ระหว่างวันที่ 19-20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ภาคบรรยาย (4) ในในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 43 (1-2) และ หน้า 146 (1-3) วิธีตรวจคัดกรองโรค และแผ่นรายงานผล ได้ใช้ในการตรวจโรคใบขาวในอ้อยในโครงการวิจัยปี 2559-2564 และโครงการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวหลายโครงการ และ เทคนิคการตรวจโรคที่พัฒนาขึ้น มีการถ่ายทอดให้เจ้าหน้าที่โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย โรงงานน้ำตาลภาคตะวันออก โรงงานน้ำตาลกุมภวาปี นักวิจัยศูนย์ขยายพันธุ์พืชเขตที่ 10 อุดรธานี ของกรมส่งเสริมการเกษตร นักวิจัยจากสำนักงานอ้อยและน้ำตาล กระทรวงอุตสาหกรรม ทั้ง 4 เขต ฯ

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์ขยายพันธุ์พืชที่ 10 อุดรธานี ของกรมส่งเสริมการเกษตรที่เอื้อเฟื้อต้นอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ขอขอบคุณ ศ.ยุพา หาญบุญทรง และผู้ช่วย ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างอ้อยเพื่อใช้ในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ ธงชัย ตั้งเปรมศรี ศุภกาญจน์ ล้วนมณี ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วันทนา ตั้งเปรมศรี นิลุบล ทวีกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ เกษม ชูสอน. 2553. การจัดการสมดุลธาตุอาหารพืชเพื่อเพิ่มความทนทานของอ้อยที่มีต่อโรคใบขาวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 302-304. ใน รายงานผลงานวิจัยศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ประจำปี 2553. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นสถาบันวิจัยพืชไร่

นิลุบล ทวีกุล. 2555. การจัดการโรคใบขาวอ้อย. เอกสารประกอบการฝึกอบรม เทคโนโลยีการผลิตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย. ณ โรงแรมเซ็นทาราคอนเวนชันเซ็นเตอร์ขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น.หน้า 319-369.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. การจัดการโรคใบขาวของอ้อย. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการผลิตและการบริการ. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนาจำกัด ขอนแก่น. 228 หน้า.

ยุพา หาญบุญทรง วรรณภา ฤทธฺสนธิ์ และ ชุตินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. วารสารวิจัย มข. 10(1): 13-21.

วันทนา เลิศศิริวรกุล อมฤต วงษ์ศิริ ศิริรัตน์ เถื่อนสมบัติ วิภาวรรณ กิติวัชระเจริญ อุดม วงศ์ชนะภัย มนตรี ปานตู ธรรมรัตน์ ทองมี. 2564. การจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาว. รายงานความก้าวหน้า โครงการวิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยประจำปี 2563. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์รังสี เจริญสถาพร ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ และ กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2558ข. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วย

เทคนิคพีซีอาร์. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 69-89.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ สุนี ศรีสิงห์ ปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. ว. แก่นเกษตร ปีที่ 40 ฉบับพิเศษ 3 หน้า 231-240.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วีรกรณ์ แสงไสย์ และ อัมราวรรณ ทิพยวัฒน์. 2562. การศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาว. รายงานผลงานวิจัยสิ้นสุด ประจำปี 2562. สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. กรมวิชาการเกษตร.

Bertaccini A, B. Duduk, S. Paltrinieri, and N. Contaldo. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. Am J Plant Sci. 5:1763–1788.

Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A (2004). "Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging". Molecular Plant-Microbe Interactions. 17 (11): 1175–1184. doi:10.1094/MPMI.2004.17.11.1175. PMID 15553243

Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hoshi, A., Maejima, K., Jung, H.Y., Yamaji, Y., S. Namba. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. FEMS Microbiology Lett; 293

Khumla, N., Sakuanrungsirikul, S., Punpee, P., Haman, T., Chaisan, T., Soulard, L and Songsri, P. 2021. Sugarcane Breeding, Germplasm Development and Supporting Genetics Research in Thailand. Sugar Tech. https://doi.org/10.1007/s12355-021-00996-2

Krejcie, R. V. & Morgan, D. W. (1970). Determining sample sizes for research activities. Educational and Psychological Measurement. 30, 607-610.

Sakuanrungsirikul, S. 2019. Sugarcane White Leaf Disease and the Sustainable Disease Management. Paper presented at the 4th Meeting of ASEAN Sugar Alliance. 17-18 June 2019. Ho Chi Minh City, Vietnam.

Sakuanrungsirikul, 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., M.J. Dickinson, and N. Boonham. 2010. Detection of *Botrytiscinerea* by loop-mediated isothermal amplification. Lett. Appl. Microbiol. 51, 650–657.