รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มผลผลิตอ้อย
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยการบริหารจัดการศัตรูอ้อย

กิจกรรมที่ 3 : การจัดการโรคใบขาวแบบผสมผสาน

กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) :** 3.5 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วย Cryotherapy และสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Efficiency of cryotherapy and some antimicrobial chemicals on the elimination of white leaf disease phytoplasma in sugarcane tissues

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1]

ผู้ร่วมงาน นางทักษิณา ศันสยะวิชัย[1] นางสาวสุนี ศรีสิงห์[2]

5. บทคัดย่อ (ภาษาไทย และภาษาอังกฤษ)

การขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดที่ยังไม่มีท่อน้ำท่ออาหาร ยังประสบปัญหาการติดโรคใบขาวในเนื้อเยื่อ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อก่อนการขยายเพิ่มปริมาณ จะทำให้ได้อ้อยปลอดเชื้อใบขาว ที่นำไปใช้ในการลดปัญหาการระบาดของโรคนี้ต่อไป

ผลการทดลองกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด ทั้งยาปฏิชีวนะในกลุ่มยับยั้งการสร้างโปรตีนของเชื้อ ได้แก่ Tetracycline, Macrolodes กลุ่มยับยั้งการสร้างเซลล์เมมเบรนและผนังเซลล์ ได้แก่ β –lactam, Cephalosporin, Quinolone กลุ่มยับยั้งการสร้างโฟเลทของเชื้อที่ส่งผลต่อการสร้างกรดอะมิโนของเชื้อ ได้แก่ Sulfonamide และ Trimethoprim และกลุ่มยับยั้งการสร้าง DNA ของเชื้อ ได้แก่ Quinolone และสารกำจัดแบคทีเรียกลุ่ม Biocide และสารสกัดธรรมชาติ รวมทั้งสิ้น 17 ชนิด โดยทดสอบในระดับความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ พบว่า แต่ละชนิดสารมีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยในระดับที่แตกต่างกันไป สารบางชนิดทำให้พืชมีการเจริญเติบโตช้า บางชนิดทำ

ให้พืชมีอาการเนื้อเยื่อตาย หลังจากได้รับสารปฏิชีวนะ 3 วัน ผลการตรวจปริมาณเชื้อที่ยีน 16S-23S rDNA และ secA ในตัวอย่างที่ทดสอบสารแล้ว 12 วัน พบว่าไม่สามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ บางชนิดสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ พบว่า Amoxicilin และ Tetracyclin ในปริมาณ 250 มิลลิกรัม ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อได้ แต่ลดได้ที่ 500 มิลลิกรัม ส่วน Clarithomycin, Azithomycin และ Ofloxacin ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อได้

ผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วย Cryotherapy พบว่าการแช่แข็งแคลลัสอ้อยด้วยขบวนการEncapsulation-vitrification ที่ไม่ใส่ Glycerol และ DMSO มีเปอร์เซ็นต์รอดเพียง 18-26 % ส่วนการแช่แข็งด้วยวิธี Encapsulation-dehydration พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตประมาณ 80% แต่แคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว พบว่าไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในแคลลัสที่เพาะเลี้ยงจากส่วนยอดของอ้อยใบขาว พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อใบขาวได้ การตรวจพิสูจน์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจเชื้อใบขาวในแคลลัสยืนยันว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว (SCWL) การตรวจเชื้อใบขาวในแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งแล้วด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าการแช่แข็งด้วยความเย็นต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง มีแนวโน้มว่าสามารถลดหรือกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยได้

ABSTRACT

Shoot apical meristem culture of sugarcane was believed to provide the best material for disease free tissue propagation based on its undifferentiated tissue stage. Practically however, sugarcane white leaf phytoplasma was still detectable in the tissue despites employing this approach. A new method to eliminate phytoplasma in plant tissue is needed for mass propagation of phytoplasma free sugarcane that was found to reduce severity of sugarcane white leaf disease eruption.

Experiment on the elimination of phytoplasma in sugarcane tissue using antibiotics processing different modes of actions, including protein synthesis inhibition ; i.e., Tetracycline, Macrolodes, cell wall and cell membrane synthesis inhibition; i.e., β –lactam, Cephalosporin, Quinolone, folate synthesis inhibition that affect amino acid synthesis, i.e., Sulfonamide, Trimethoprim, DNA synthesis inhibition, i.e., Quinolone, Bactericidal compounds, i.e., biocide and plant natural extract, altogether 17 types were investigated with varied antibiotic concentrations and exposure times. It was found that each compound revealed different affectivity to plant tissues. Some compounds affected plant growth while some resulted in tissue necrosis after 3 days exposures. The detection of phytoplasma concentration in leaf tissues after 12 days exposures, targeting 16S-23S rDNA and secA genes in phytoplasma showed

detectable phytoplasma DNA bandings with reduction banding intensity in some treatments. Amoxicilin and Tetracyclin at 2 5 0 miiligram showed no change in phytoplasma concentration but reduction was noticeable at 500 milligram. Clarithomycin, Azithomycin and Ofloxacin showed no affectivity on phytoplasma concentration.

Investigation on the efficiency of cryotherapy on the elimination of phytoplasma in plant tissue showed 18-26 % callus viability employing encapsulation-vitrification approach excluded the addition of glycerol and DMSO. Encapsulation-dehydration, on the other hand, showed 80% callus viability. However, cryo-treated calli were not germinate-able into plantlet. White leaf phytoplasma were detectable in calli cultured from shoot tip of sugarcane with white leaf symptom. Sequencing of the PCR product obtained from this detection revealed complete similarity to sugarcane white leaf phytoplasma (SCWL) in the database. Investigation of phytoplasma in cryo-treated calli by PCR methods indicated possibility of this technique in the reduction of phytoplasma in plant tissues.

---

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น [2] ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี

6. คำนำ

ในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักประสบปัญหาการติดโรคใบขาวในชิ้นส่วนที่นำใช้ในการขยายพันธุ์ แม้จะเป็นในส่วนเนื้อเยื่อที่มีการรายงานศึกษาแล้วว่าเป็นตำแหน่งที่ปลอดจากเชื้อชนิดนี้แล้ว แต่พบว่าต้นอ้อยที่ได้ส่วนใหญ่ยังตรวจพบเชื้อใบขาวได้ และบางต้นแสดงอาการของโรคใบขาวในแปลง แม้จะได้ทำการสุ่มตรวจโรคด้วยวิธี nested-PCR แล้วก่อนทำการขยายพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องเชื้อไฟโตพลาสมามีการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอภายในต้นอ้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่เชื้อมีปริมาณต่ำมาก ทำให้ตรวจไม่พบเชื้อในตัวอย่างที่สุ่มตรวจ นอกจากนี้แล้วการหาต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อมาใช้ในการขยายพันธุ์ ยังเป็นสิ่งที่กระทำได้ยากมาก เนื่องจากต้นอ้อยส่วนใหญ่มีการติดเชื้อแล้วทั้งนั้น ดังนั้นหากมีวิธีที่สามารถกำจัดเชื้อโรคใบขาวในชิ้นส่วนที่จะนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะทำให้การขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และได้ต้นที่ปลอดเชื้ออย่างแท้จริงสำหรับการขยายพันธุ์

ปัจจุบันได้มีรายงานการนำเทคนิคการบำบัดด้วยความเย็นต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Cryotherapy) มาใช้ในการรักษาโรคเนื่องจากอุณหภูมิที่เย็นจัดทำให้เกิดการตกผลึกของน้ำภายในเซลล์ ในทางการแพทย์ได้มีการนำมาใช้ทำลายเนื้อเยื่อที่ผิดปรกติ เช่น หูด ไฝ และโรคผิวหนังบางชนิด เช่นโรคสะเก็ดเงิน

(http://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=cryo 19 มิ.ย. 54) มีการนำเทคนิค Cryotherapy มาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคในพืชด้วยเช่นกัน โดยพบว่าสามารถกำจัดเชื้อไวรัส ไฟโตพลาสมา และแบคทีเรียจากพืชได้ โดยใช้ตัวอย่าง shoot tips ในการทำ ซึ่งทำให้สามารถทำได้หลายตัวอย่างพร้อมๆกัน ทำให้การขยายพันธุ์ต้นปลอดเชื้อมีประสิทธิภาพมาก (Wang and Valkonen, 2009) ในปี 1997 Briston และคณะใช้เทคนิค cryotherapy ในการกำจัดเชื้อไวรัส (*Plum pox virus*) จากต้นตอของพืชสกุล *Prunus* ได้สำเร็จโดยการใช้วิธี vitrification กับชิ้นส่วนปลายยอด (shoot tips) นอกจากนี้ยังมีการใช้วิธี encapsulation vitrification ในการกำจัดเชื้อ *Grapevine virus A* จาก grapevine ได้สำเร็จเช่นกัน ซึ่งพบว่ามีเปอร์เซนต์ต้นปลอดเชื้อถึง 97% เทียบกับวิธีการขยายพันธุ์ด้วยปลายยอดโดยไม่ผ่าน cryotherapy ที่ได้ต้นปลอดเชื้อเพียง 12% เท่านั้น (Engelmann, 2004) Wang และ Valkonen (2009)ได้รายงานการใช้วิธีการนี้กำจัดไวรัสในเนื้อเยื่อพืชอีกหลายชนิด รวมถึงการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาจากเนื้อเยื่อของพืชด้วย โดย ใช้เทคนิค cryotherapy กำจัดเชื้อ sweet potato little leaf phytoplasma (SPLL) และ *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* ในเนื้อเยื่อปลายยอด (shoot tips) ของมันเทศได้ถึง 100% เมื่อเทียบกับวิธีเดิมที่ไม่ผ่าน cryotherapy และใช้การขยายพันธุ์ด้วยเนื้อเยื่อ meristem พบว่ามีเพียง 10% เท่านั้นที่ไม่มีเชื้อ (Wang and Valkonen, 2008)

สำหรับรายงานการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) และยาปฏิชีวนะ (antibiotic) บางชนิดนั้น Aldaghi และคณะ (2008) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ nisin, esculentin, pyrithione และ chloramphenicol รวมทั้ง essential oil บางชนิด ได้แก่ carvacrol, eugenol, terpineol, alpha-pinener ซึ่งมีฤทธิต้านเชื้อราและแบคทีเรีย เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด ได้แก่ tetracycline และ enrofloxacin และวัดหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย real time PCR หลังจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารดังกล่าวเป็นเวลา 1 ถึง 2 เดือน พบว่า ในเนื้อเยื่อที่เลี้ยงในอาหารที่มี pyrithion ระดับ 10 และ 100 ppm ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา รวมทั้งยังพบว่าสารบางชนิดยังทำให้ปริมาณเชื้อต่ำลงได้อีกด้วย ส่วน Askari และคณะ (2011) รายงานว่าสารผสมระหว่าง surfactin และ tetracycline อัตราส่วน 1: 1 สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมา *Candidatus P. aurantifolia* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมักใช้ส่วนของ apical meristem ซึ่งเป็นส่วนที่มีรายงานว่าปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาเนื่องจากยังไม่มีการพัฒนาของท่อน้ำ ท่ออาหารซึ่งเป็นที่อยู่ของเชื้อนี้ แต่ในทางปฏิบัติพบว่าการตัดให้ได้ชิ้นส่วนเฉพาะตำแหน่งดังกล่าวกระทำได้ค่อนข้างยาก เพราะมีขนาดเล็กมาก และเมื่อนำไปผ่านขบวนการฟอกฆ่าเชื้ออีก เนื้อเยื่อเหล่านั้นส่วนใหญ่มีเปอร์เซ็นต์ความงอก

ต่ำมาก แต่หากตัดชิ้นส่วนให้มีขนาดใหญ่ขึ้นก็จะได้ต้นที่ติดเชื้อทำให้การขยายพันธุ์มีประสิทธิภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามอ้อยที่มีการปลูกในแหล่งปลูกต่างๆ เกือบทั้งหมดมีการติดเชื้อโรคใบขาวแล้ว ในระดับที่ต่างๆ กันไป จากผลการวิจัยของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นพบว่าการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยน้ำร้อนไม่สามารถกำจัดเชื้อได้ ต้นที่มีเชื้อสามารถแสดงอาการใบขาวได้อีกเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดโรค หากแช่น้ำร้อนนานขึ้น ก็ทำให้ต้นตายได้ เนื่องจากไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ ที่อาศัยอยู่ภายใน sieve cell ของท่ออาหาร จึงเป็นเซลล์ที่ค่อนข้างอ่อนแอ การแช่แข็งในอุณหภูมิต่ำมากๆ จะส่งผลให้โมเลกุลน้ำภายในเซลล์เกิดการแข็งตัวและตกผลึกในสภาวะที่เหมาะสม อาจจะทำให้เซลล์นี้ตายได้ นอกจากนี้ตำแหน่งที่เชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่เป็นตำแหน่งที่ยาปฏิชีวนะหรือสารต้านจุลชีพเข้าถึงได้ง่าย ดังนั้นหากใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารที่เหมาะสมที่ไม่มีผลต่อเมตาโบลิสมของพืชก็อาจจะกำจัดเชื้อชนิดนี้ได้เช่นกัน ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยวิธี Cryotherapy และประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยยาปฏิชีวนะบางชนิด เพื่อหาแนวทางในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยที่มีประสิทธิภาพ สำหรับนำมาใช้ในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อเพื่อลดปัญหาการระบาดของโรคใบขาวในประเทศไทย

7. วิธีดำเนินการ

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยวิธี cryotherapy และการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR มีขั้นตอนดังนี้

1. การฟอกฆ่าเชื้อและชักนำแคลลัส

เพาะตาอ้อยในกระบะทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ประมาณ 1 เดือน เมื่อได้ต้นอ้อยประมาณ 20 ซม. แล้วเก็บต้นอ้อยมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox (ส่วนประกอบหลัก คือ sodium hypochlorite 6% w/w) ความเข้มข้น 30% ที่เติม Tween20 ประมาณ 2-3 หยดเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3-4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นลอกเปลือกหุ้มออกประมาณ 2-3ชั้น และหั่นเป็นชิ้นเล็กก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารสูตรMurashige and Skoog's (MS) ที่เติมฮอร์โมน2,4-D ความเข้มข้น 2 mg/l และ kinetin ความเข้มข้น 0.5 mg/l เพื่อชักนำให้เจริญไปเป็นแคลลัสโดยเพาะเลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในขั้นตอนต่อไป

2.การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยวิธี cryotherapy

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อแคลลัสอ้อย ด้วยวิธี cryotherapy ร่วมกับเทคนิค encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 การแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification

encapsulation-vitrificationคือ การใช้สารเคมีร่วมกับการสร้างเมล็ดเทียม(artificial seed)เพื่อห่อหุ้มและปกป้องเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็ง เริ่มจากการนำเนื้อเยื่ออ้อยแต่ละชนิดมาเลี้ยงในอาหารเหลว MS ที่มี sucrose ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม เป็นเวลา 1-2 วัน สร้างเมล็ดเทียมด้วย 2% sodium-alginate ในอาหารเหลว MS ที่มี sucrose 0.4 M และทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิเหมาะสมคือ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งอุณหภูมิดังกล่าวมีผลต่อการฟอร์มตัวของเมล็ดเทียมและประสิทธิภาพในการปกป้องเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็ง (ภาพที่ 1)และหยดลงใน calcium chloride 0.1 M แช่ไว้ประมาณ 30 นาที และย้ายลงบนเพลท (plate) ทิ้งไว้ใน laminar flow เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายลงใน LS (2 M glycerol และ 0.4 M sucrose)เป็นเวลา 20นาที จากนั้นย้ายลงหลอด vial cryoที่มี PVS1, PVS2 และ PVS3 (ตารางที่ 1)แล้วแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง 1) นำเมล็ดเทียมดังกล่าวแช่ในสารละลาย PVS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 12 นาที2) นำเมล็ดเทียมแช่ในสารละลาย PVS ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 50 นาที แล้วนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 12 นาที จากนั้นละลายผลึกน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส แล้วย้ายลงในสารละลาย LS1 (2 M glycerol และ 1.2 M sucrose) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวลงในอาหารเหลวสูตร MS หรืออาหารสูตร MS ที่มีการเติมฮอร์โมนเพื่อชักนำให้เจริญเป็นแคลลัสเขย่าข้ามคืน แล้วผ่าเมล็ดเทียมที่หุ้มแคลลัสออกก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l kinetin ประมาณ 1 เดือนเพื่อพักฟื้น (ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในวันที่ 2 หลังจากการแช่แข็ง โดยสังเกตจากสีของแคลลัส เปรียบเทียบกับแคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง) ก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 0.5 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l kinetin เพื่อชักนำให้เกิดต้นต่อไป

Table 1. Key chemical components in PVS medium.

PVS	Key chemical components (%w/v)			
	Glycerol	Ethylene glycol	DMSO	Sucrose
PVS1	-	-	10	10.3
PVS2	30	15	15	13.7
PVS3	50	-	-	50

2.2 การแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

encapsulation-dehydration คือ การสร้างเมล็ดเทียมเพื่อห่อหุ้มเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็งร่วมกับดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารMS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเพื่อให้เหลือน้ำประมาณ 20% ของน้ำหนักสด ก่อนนำเนื้อเยื่อไปแช่เย็นในไนโตรเจนเหลว โดยสร้างเมล็ดเทียมหุ้มเนื้อเยื่ออ้อยแต่ละชนิดด้วย 2% sodium-alginate ในอาหารเหลว MS ที่มี sucrose ความเข้มข้น 0.4 M จากนั้นหยดลงใน calcium chloride ความเข้มข้น 0.1 M แช่ไว้ประมาณ 30 นาที แล้วย้ายลงในอาหารเหลว MS ที่มี sucrose ความเข้มข้น 0.75 Mเป็นเวลา 1วัน หลังจากนั้นย้ายลงบนเพลท (plate) ทิ้งไว้ใน laminar flow เป็นเวลา 1ชั่วโมง ก่อนย้ายลงหลอด vial cryoแล้วนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 12 นาที จากนั้นละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ผ่าเมล็ดเทียมที่หุ้มแคลลัสออก แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l kinetin ประมาณ 1 เดือนเพื่อพักฟื้น (ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังจากนั้น 1 สัปดาห์ โดยสังเกตจากสีของแคลลัส เปรียบเทียบกับแคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง) ก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 0.5 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l kinetin เพื่อชักนำให้เกิดต้นต่อไป

2.3 การพัฒนาการแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

encapsulation-dehydration คือ การสร้างเมล็ดเทียมเพื่อห่อหุ้มเนื้อเยื่อจากการถูกทำลายด้วยผลึกน้ำแข็งร่วมกับดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยการเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารMS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเพื่อให้เหลือน้ำประมาณ 20% ของน้ำหนักสด ก่อนนำเนื้อเยื่อไปแช่เย็นในไนโตรเจนเหลว โดยสร้างเมล็ดเทียมหุ้มเนื้อเยื่ออ้อยแต่ละชนิดด้วย 3% sodium-alginate ในอาหารเหลว MS ที่มี sucrose ความเข้มข้น 0.4 M จากนั้นหยดลงใน calcium chloride ความเข้มข้น 0.1 M แช่ไว้ประมาณ 30 นาที แล้วย้ายลงในอาหารเหลว MS ที่มี sucrose ความเข้มข้น 0.75 Mเป็นเวลา 1, 2 และ 3 วัน หลังจากนั้นย้ายลงบนเพลท (plate) ทิ้งไว้ใน laminar flow เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนย้ายลงหลอด vial cryoแล้วนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 12นาที จากนั้นละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ผ่าเมล็ดเทียมที่หุ้มแคลลัสออก แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่มี 2 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l kinetin ประมาณ 1 เดือนเพื่อพักฟื้น (ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในวันที่ 2 หลังจากการแช่แข็ง โดยสังเกตจากสีของแคลลัส เปรียบเทียบกับแคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง) ก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่มี 0.5 mg/l 2,4-D และ 0.5 mg/l kinetin เพื่อชักนำให้เกิดต้นต่อไป

3. การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยยาปฏิชีวนะบางชนิด

3.1 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้สาร Myco-1&2

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสาร Myco-1&2 (AppliChem) โดย Myco-1 มียาปฏิชีวนะ Tiamulin และ Myco-2 มียาปฏิชีวนะ minocycline ที่เป็นอนุพันธ์ของ tetracycline เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อด้วยการนำต้นอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามาตัดเป็นท่อนขนาด 1 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม Myco-1 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร และนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบประมาณ 150 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่มีแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วย้ายลงอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม Myco-2 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร เป็นเวลา 3 วัน โดยทำซ้ำทั้งหมด 4 รอบ จากนั้นย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อให้อ้อยเจริญเป็นต้นและนำไปตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR และศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยนำอ้อยที่ผ่านการทดสอบมาทดลองซ้ำด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น 2-3 ครั้ง

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้สาร Cotrimoxazole

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสาร Cotrimoxazole หรือ Sulfamethoxazole/ Trimethoprim (40/ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งเป็นยาในกลุ่มซัลฟา (sulfonamide) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อด้วยการนำต้นอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามาตัดเป็นท่อนขนาด 1 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม Cotrimoxazole โดยแปรผันความเข้มข้นที่ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ย้ายทุกๆ 4 และ 3 วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อให้อ้อยเจริญเป็นต้นและนำไปตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR และศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยนำอ้อยที่ผ่านการทดสอบมาทดลองซ้ำด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น 2-3 ครั้ง

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้สาร Preservative for Plant Tissue Culture Media

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสาร Preservative for Plant Tissue Culture Media (PPM) (Plant Cell Technology) เป็นสารในกลุ่ม biocide ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือ 5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazolone และ 2-Methyl-3(2H)-isothiazolone มีประสิทธิภาพในการป้องกันและลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียและเชื้อรา รวมถึงเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในพืช (endophyte) การศึกษา

ประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อด้วยการนำต้นอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามาตัดเป็นท่อนขนาด 1 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร ¼ MS ที่เติม PPM 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร เป็นเวลา 5, 7 หรือ 14 วัน โดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า และย้ายลงอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PPM 0.5 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร ย้ายลงอาหารใหม่ที่เติม PPM ทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงบนอาหารแข็งสูตร MS เพื่อให้อ้อยเจริญเป็นต้นและนำไปตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR

3.4 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้สาร active natural extracts

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสาร active natural extracts 14 ชนิด ใน herbapeutic oral rinse; DENTISTE' ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อด้วยการนำต้นอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมามาตัดเป็นท่อนขนาด 1 เซนติเมตร นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม DENTISTE' โดยแปรผันความเข้มข้นที่ 10, 25 และ 50% (v/v) นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง หรือ 2 และ 4 วัน (ย้ายต้นอ้อยลงอาหารใหม่ที่เติมสารทุกวันจนครบระยะเวลาที่กำหนด) ย้ายลงบนอาหารเหลวสูตร MS เป็นเวลา 5 วัน ทดลองซ้ำ 3-4 ครั้ง แล้วย้ายลงบนอาหารสูตร MS เพื่อให้อ้อยเจริญเป็นต้นและนำไปตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR

3.5 .การเตรียมต้นกล้าอ้อยเพื่อนำเนื้อเยื่อยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยง

คัดเลือกต้นอ้อยที่ไม่ปรากฏอาการและปรากฏอาการของโรคใบขาว โดยเลือกลำที่สมบูรณ์ มีจำนวนปล้องมาก และมีอายุระหว่าง 8-10 เดือน นำอ้อยแต่ละลำมาตัดเป็นท่อนๆละ 1 ตา หลังจากนั้นนำท่อนพันธุ์ที่ไม่ต้องการให้มีเชื้อไฟโตพลาสมามาแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำท่อนพันธุ์ดังกล่าวไปเพาะในกระบะทราย โดยใช้ทรายที่อบฆ่าเชื้อแล้ว

3.6 การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลงเอ็มเอส

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญอ้อย ในการทดลองนี้ใช้อาหารเหลว สูตรอาหาร (ดังที่แสดงตาราง) แล้วจึงมาใช้ตามปริมาตรของสูตรอาหารเอ็มเอสต่างๆ โดยสูตรอาหารเอ็มเอส1 เป็นสูตรที่ช่วยยืดเนื้อเยื่อยอดอ่อนให้ยาวขึ้น เตรียมจากสูตรเอ็มเอสมาตรฐาน แล้วเพิ่มสารจิบเบอร์เรลลิค แอสิดหรือสารจีเอ (giberellic acid หรือ GA 0.1 มิลลิกรัม/ลิตรและ Indole-3 butyric acid หริ IBA 0.01 มิลลิกรัม/ลิตร สูตรเอ็มเอส2 เป็นสูตรเอ็มเอส2 เป็นสูตรอาหารเพื่อการแตกหน่อ เตรียมจากสูตรเอ็มมาตรฐานแล้วเติมสารเบนซิลอะมิโนพิวรีน หรือบีเอ (benzyl aminopurine (BAP)) อัตรา 2 มิลลิกรัม/ลิตรและสูตรเอ็มเอส3 เป็นสูตรเอ็มเอสมาตรฐาน ที่ไม่ต้องเติมสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช เติมน้ำตาล 20 กรัม/ลิตรในอาหารเอ็มเอส1 และเอ็มเอส2 และ 10 กรัม/ลิตร ในสูตรเอ็มเอส3 ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของอาหารทุกสูตรให้อยู่ที่ 5.6-5.8 หลังจากนั้นจึงแบ่งอาหารใส่ขวด สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นำไปนึ่งเพื่อฆ่า

เชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยไว้ให้เย็นก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวผลิตหน่ออ้อยได้มากกว่าและเจริญเติบโตรวดเร็วกว่า

3.7 การย้ายหน่ออ่อนลงอาหารที่มียาปฏิชีวนะ

ในการทดลองนี้จะที่เติมสารปฏิชีวนะในอาหารให้มีปริมาณ 250 และ 500 มิลลิกรัม ในอาหาร 20 มิลลิลิตร (ตารางที่21) และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 3 วัน ในขั้นตอนนี้ต้องปฏิบัติด้วยความระมัดระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนทำการทดสอบทั้งหมด 12 วัน

4.การตรวจเชื้อโรคใบขาว

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ้อยหรือเนื้อเยื่อแคลลัสจากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ โดยดัดแปลงวิธีของ Li and Midmore (1999) เริ่มด้วยบดตัวอย่างใบอ้อยหรือเนื้อเยื่อจากหลอดทดลองในสภาพปลอดเชื้อ 0.2 กรัม ใน extraction buffer ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พลิกหลอดไปมาทุก 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม Chloroform : Isoamyl(24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตรกลับหลอดไปมาเบาๆ จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนจำนวน 2 รอบด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดีดให้ตะกอนลอย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 1 นาทีแล้วตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติม TE buffer ที่มี RNase A ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยีน 16S rDNA ด้วย nested-PCR : นำดีเอ็นเอที่สกัดมาได้มาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR ขั้นตอนแรกใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณ 16S - 23S rDNA(MLO-X, MLO-Y, P1, P2) ตามรายงานของพรทิพย์และคณะ (2542) และใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณตามรายงานของศุจิรัตน์และคณะ (2542) มีรายละเอียดดังนี้ ขั้นที่ 1 ในหลอดทดลองปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM Mg_2Cl, 0.2 mMdNTP, 0.5 uM Primer MLO-X, 0.5 uM Primer MLO-Y,0.1 U Taq polymerase and DNA template ความเข้มข้น 100 ng/ulปริมาตร 3 ulตั้งโปรแกรมการทำ PCR ครั้งที่1 ดังนี้95 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที, 55 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที จำนวนรอบ 24 รอบ แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาเจือจางสัดส่วน 1:100 (1st-PCR product)สำหรับใช้ในขั้นตอนที่ 2 ในหลอดทดลองปฏิกิริยาสุทธิ 15 ulประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM Mg_2Cl, 0.2 mMdNTP, 0.5 uM Primer P1, 0.5 uM MLO-X, 0.5 uM Primer P2, 0.1 U Taq polymerase and DNA template (1st-PCR product) 3 ul และโปรแกรมที่ใช้ในการทดลองนี้ประกอบด้วย 95 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที, 60 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาที และ 72 องศา

เซลเซียสนาน 1 นาที จำนวนรอบ 25 รอบ นำผลผลิตที่ได้จากทั้ง 2 ขั้นตอน มาผสมกับ loading dye ที่มี SYBER GREEN จำนวน 1.5 ulแล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตโฟริซิส บนวุ้นอะกาโรส1.5% ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใน0.5 x TEB เป็นเวลา40 นาที แล้วตรวจวัดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยีน secA ด้วย direct PCR : ทำปฏิกิริยา PCR 15 ไมโครลิตร มีส่วนประกอบดังนี้ template DNA 100 ng 3 ไมโครลิตร,10x *Tag* reaction buffer 1.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$1.5 ไมโครลิตร, 2.5 µM dNTP 1.2 ไมโครลิตร, 10 µM F/R primer SecA 0.75 ไมโครลิตร ddH_2O นึ่งฆ่าเชื้อ 5.35 ไมโครลิตร นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง PCR thermal cycle ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที ตั้งโปรแกรมจำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 วินาที, 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที , 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

Table 2. Details of antibiotics used in elimination of phytoplasma in sugarcane tissues.

Active components	Commercial names	Active groups	Modes of action
Tetracycline	Heromycin	Tetracycline	Protein synthesis inhibitors via blocking of bacterial ribosome 30s subunit .
Oxytetracycline	Oxycline soluble		
Erythomycin	Erycon	Macrolides	Protein synthesis inhibitors via blocking at 50 s ribosomal RNA of bacteria.
Azithomycin	Azithro		
clarithromycin	clarithromycin		
Penicillin	Penicillin V 500,000 I.U.	B-lactam	Bacterial cell wall synthesis inhibitor.
Cephalexin	Farmalax-500	Cephalosporin	
Amoxicillin	Moxilin-500	B-lactam	
Ciprofloxacin	Microflox-500	Quinolone	DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitors.
Ofloxacin	Oflocee 200	Quinolone	
Levofloxacin	Olfovel-500	Quinolone	
Sulfamethoxazole+ Trimethoprim	Plocanmad-M600	Sulfonamide	Bacterial cell membrane and cell wall synthesis inhibitor. Dihydropteroate synthase inhibitor reduce cell growth.
Plasmocin	Plasmocin Treatment	Macrolid+	Protein synthesis inhibitors via

		quinolone	blocking 30s and 50s subunit of bacterial ribosome. DNA gyrase and topoisomerase IV inhibitor.
Clavulanic acid (rINN)		β-lactam	β-lactamase inhibitor

เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2557-2558 สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. **ผลการทดลองและวิจารณ์**

8.1. การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด

การทดลองการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยยาปฏิชีวนะ myco-1 and 2 ซึ่งเป็นยาปฏิชีววนะในกลุ่ม Tiamulin และ Minocycline โดยใช้ 2-step treatment และมีการทดสอบจำนวน 3 รอบ โดยใช้ทดสอบในเนื้อเยื่ออ้อยที่มีปริมาณเชื้อมาก (700 bp) เมื่อทำการตรวจปริมาณเชื้อด้วย nested-PCR พบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอตำแหน่ง 700 bp ในกลุ่มต้นควบคุมที่ไม่ได้รับยา และไม่พบดีเอ็นเอตำแหน่งนี้ในต้นที่มีการใช้ยา แต่ยังพบดีเอ็นเอขนาด 210 bp ในทุกตัวอย่าง เมื่อตรวจพิสูจน์ด้วย secA สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอได้เช่นกัน แสดงว่าการใช้ยานี้สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อให้หมดไปได้ ทั้งนี้ยังไม่มีการตรวจปริมาณเชื้อด้วย RT-PCR เพื่อดูความมีชีวิตของเชื้อ

การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยยาปฏิชีวนะCotrimoxazole หรือ Sulfamethoxazole ร่วมกับ Trimethoprim (40 : 8 mg/ml)โดยแปรผันความเข้มข้นที่ 25, 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร พบว่า ที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหาร มีผลต่อการเจริญเติบโตของอ้อย ส่วนการใช้ความเข้มข้น 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรของอาหารเป็นเวลาที่ 5, 7 และ 14 วัน จากนั้นย้ายลงอาหารเหลว MS เปลี่ยนอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ จนครบ 1 เดือน รวมทั้งการทดลองโดยใช้สาร Preservative for Plant Tissue Culture Media (PPM)ซึ่งเป็นสารกลุ่ม biocide มีส่วนประกอบหลัก คือ 5-Chloro-2-methyl-3(2H)-isothiazoloneและ 2-Methyl-3(2H)-isothiazoloneเป็นเวลาที่ 5, 7 และ 14 วันจากนั้นย้ายลงอาหารเหลว MS ที่เติม PPM 0.5µl/ml และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ จนครบ 1 เดือน ให้ผลในการลดเชื้อลงได้เช่นเดียวกัน แต่ไม่สามารถกำจัดเชื้อได้

ผลการตรวจพิสูจน์เชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาด 210bp ที่ตรวจพบในตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยสารต้านจุลชีพชนิดต่าง พบว่ายืนยันว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย (SCWL)

การทดลองกำจัดเชื้อด้วยActive natural extract (DENTISTE')ที่ความเข้นข้น 10, 25 และ 50% เป็นเวลา 2 และ 4 วัน รวมทั้งการใช้ที่ความเข้มข้น 10% กำจัดเชื้อในระยะเวลา 3 และ 6 ชม.พบว่าต้นอ้อยมีลักษณะซีดและตายในที่สุด

การทดสอบประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะในการกำจัดเชื้อโรคใบขาวในต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงในสภาพเนื้อเยื่อจำนวน 14 ชนิด ได้แก่ Sulfamethoxazole +Trimethoprim, Oxytetracycline, Plasmocin, Ciprofloxacin, Levofloxacin, Cephalexin, Amoxicillin+Clavulanic acid, Amoxilcillin , Penicillin , Clarithomycin, Erythomycin, Azithomycin ,Ofloxacin และTetracycline ที่มีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันต่อเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 1 ที่ปริมาณต่อตัวอย่างพืช 250 และ 500 มิลลิกรัม พบว่า แต่ละชนิดสารมีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยในระดับที่แตกต่างกันไป เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ที่ไม่ได้รับสารปฏิชีวนะ สารบางตัวที่มีผลกระทบต่อพืช ทำให้พืชมีการเจริญเติบโตช้า เช่น Sulfamethoxazole+Trimethoprim บางชนิดทำให้พืชมีอาการเนื้อเยื่อตายและซีด หลังจากได้รับสารปฏิชีวนะ 3 วัน เช่น Clarithomycin, Tetracycline, Penicillin, Oxytetracycline, Cephalexin และ Ciprofloxacin

ผลการตรวจปริมาณเชื้อในตัวอย่างเนื้อเยื่ออ้อยที่ทดสอบด้วยสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ โดยการเติมสารปฏิชีวนะลงในอาหารให้มีปริมาณ 250 และ 500 มิลลิกรัม ทำการทดสอบทั้งหมด 12 วัน โดยเปลี่ยนอาหารพร้อมสารปฏิชีวนะใหม่ทุก 3 วัน พบว่า สารปฏิชีวนะและปริมาณที่ใช้ยังไม่สามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ แต่สามารถลดปริมาณได้ในระดับหนึ่งเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับสารปฏิชีวนะ จากการตรวจปริมาณเชื้อที่ตำแหน่ง 16S-23S rDNA ด้วยเทคนิค Nested PCR และตรวจ secA ด้วย Direct PCR โดยพบว่า Amoxicilin และ Tetracyclin ในปริมาณ 250 มิลลิกรัม ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อได้ แต่ลดได้ที่ 500 มิลลิกรัม ส่วน Clarithomycin, Azithomycin และ Ofloxacin ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อได้ (ภาพที่ 1)

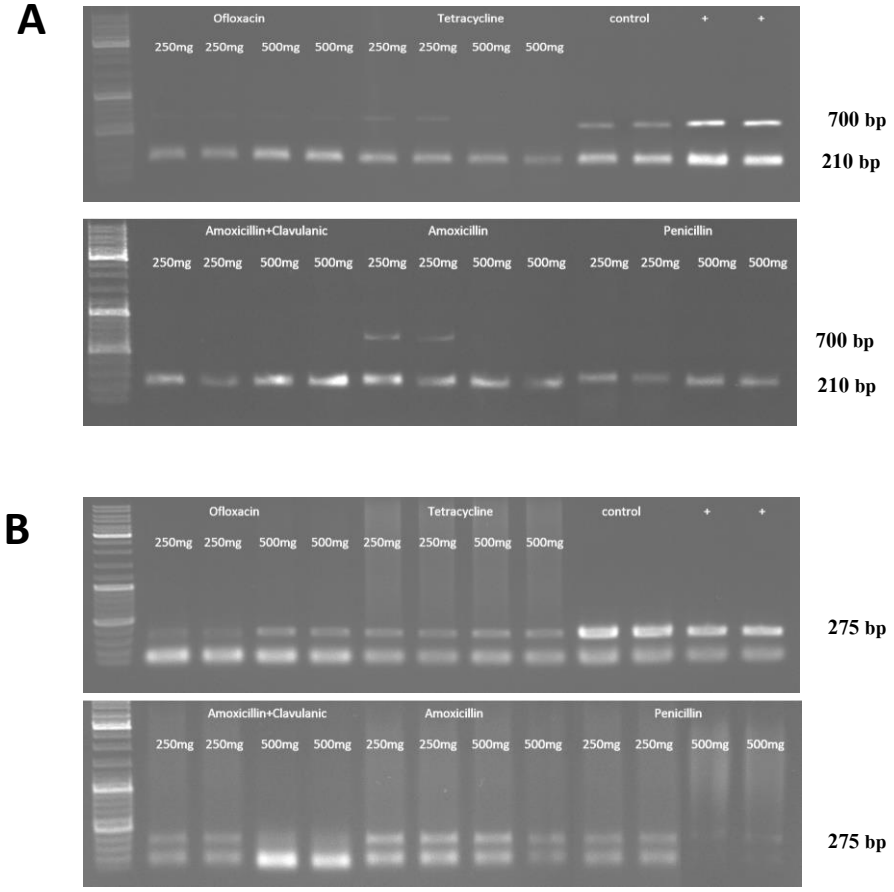


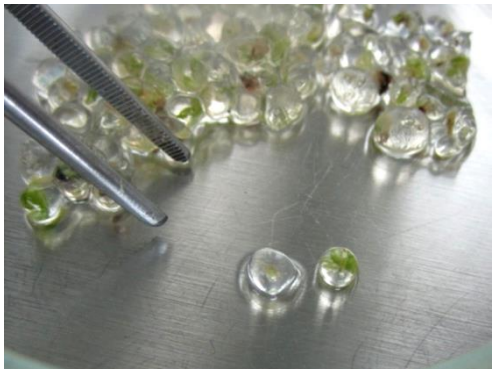
Figure 1. Sugarcane white leaf phytoplasma concentration in leaf of sugarcane platelets cultivated in 250 and 500 milligram of various antibiotics supplemented in MS medium for 12 days exposure. Phytoplasma was estimated by (A) Nested-PCR targeted 16S-23S rDNA gene. Detectable DNA fragment at 700 bp indicates high phytoplasma concentration (10^3 copies/ µl 25 ng plant DNA and over). (B) Direct PCR targeted partial secA gene. Observable DNA banding at 275 bp indicates phytoplasma concentration at 10^2 copies/ µl 25 ng plant DNA and over. Tested antibiotics were Ofloxacin, Tetracycline, Amoxicillin+Clavulanic acid, Amoxicilin and Pennicilin. Control: No antibiotic supplement. + : white leaf

8.1.2 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วย Cryotherapy

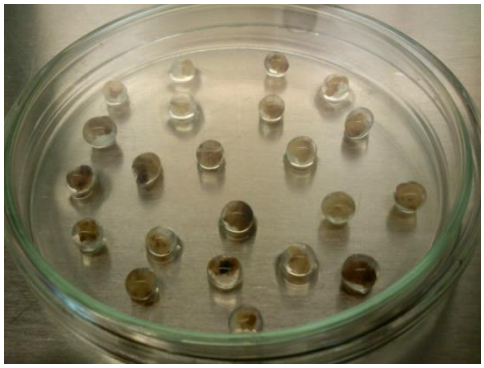
ทดสอบเทคนิคการแช่แข็งโดยใช้แคลลัสอ้อย ทำการพัฒนาวิธีการแช่แข็งด้วยขบวนการ Encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

8.1.2.1 ผลการสร้างเมล็ดเทียม (encapsulation)

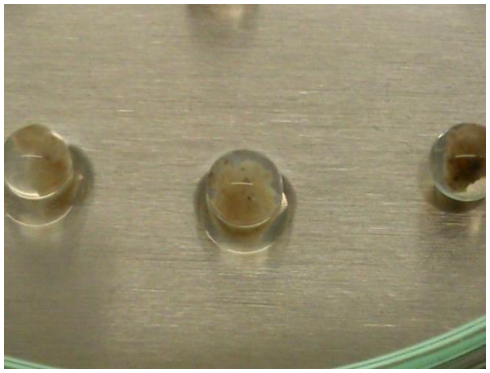
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลาย 2% และ 3% sodium-alginate สำหรับการเตรียมเมล็ดเทียม พบว่าอุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ (autoclave) sodium-alginate มีผลต่อการฟอร์มตัวของเมล็ดเทียม โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 110 องศาเซลเซียส 15 นาที ทำให้ได้เมล็ดเทียมที่มีรูปทรงกลมและสามารถห่อหุ้มเนื้อเยื่อได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 20 นาที ดังภาพที่ 2



(A)



(B)



(C)

Figure 2. Sugarcane calli in artificial seeds made from 2% sodium-alginate with different sterilizing temperatures. (A) 121°C 20 min. (B) and (C) 110°C 15 min.

8.1.2.2. ผลการแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-vitrification

การทำ cryotherapy ด้วยวิธี encapsulation-vitrificationแล้วนำมาเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสประมาณ 1สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์รอด ประมาณ 18-26 % เมื่อสังเกตจากสีของแคลลัสที่ยังมีชีวิตจะมีสีเหลือง (ดังลูกศรชี้ในภาพที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการทำcryotherapyสำหรับแคลลัสที่ไม่มีชีวิตมีลักษณะสีขาวซีด (ภาพที่ 3) โดยจะพบว่าสาร PVS1 และ PVS3 ให้ผลการรอดชีวิตของแคลลัสได้ดีตามลำดับ และไม่พบการรอดชีวิตของแคลลัสเมื่อใช้สาร PVS2

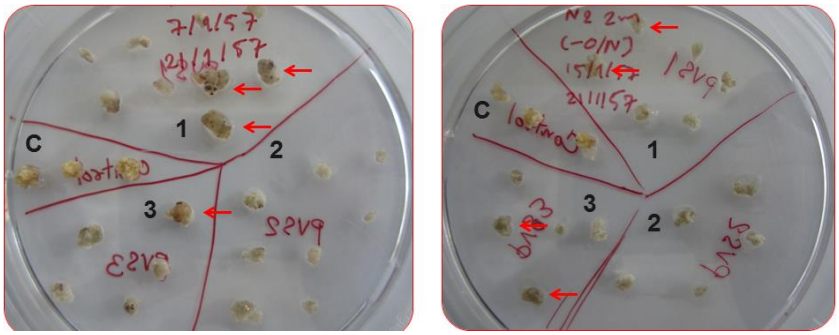


Figure 3. Viability of sugarcane cryo-treated calli via encapsulation-vitrification, cultivated in callus induction medium after 1 week. C: control callus. 1, 2 and 3 : cryo-treated calli via vitrification using PVS1, PVS2 and PVS3 respectively. Arrow : survived calli.

8.1.2.3. ผลการแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration

การทำ cryotherapyด้วยวิธี encapsulation-dehydration ในข้อ 2.2 แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารชักนำแคลลัสประมาณ 1 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิต ประมาณ 72 % เมื่อสังเกตจากสีของแคลลัสที่ยังมีชีวิตจะมีสีเหลือง (ดังลูกศรชี้ในภาพที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับแคลลัสชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการทำ cryotherapyสำหรับแคลลัสที่ไม่มีชีวิตมีลักษณะสีขาวซีด (ภาพที่ 4) โดยการทำ encapsulation-dehydration นี้พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่า encapsulation-vitrificationดังนั้นจึงต้องการพัฒนาวิธีการแช่ด้วยวิธีการดังกล่าวไว้ในข้อ 2.3 โดยเพิ่มความเข้มข้น sodium-alginate ขึ้นจากเดิม 2 % เป็น 3 % และเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 0.75 M sucrose เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์ของแคลลัสจากเดิม 1 วัน เป็น 2 และ 3 วัน ก่อนนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวผลที่ได้พบว่าแคลลัสมีอัตราการรอดชีวิต ประมาณ 100% ตามลำดับ (ภาพที่ 5) ดังนั้นสำหรับการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้การแช่แข็งโดยวิธี encapsulation-dehydration โดยใช้sodium-alginate ความเข้มข้น3 %และเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 0.75 sucrose เป็นเวลา 2 วัน ซึ่งเป็นวิธีทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตดีไม่แตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 0.75 sucrose เป็นเวลา 2 วัน

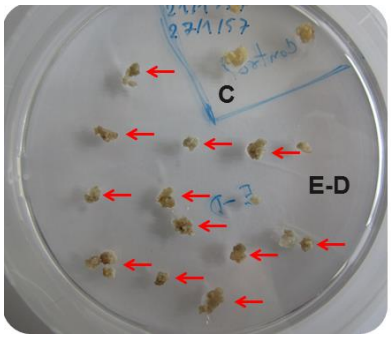


Figure 4. Cryo-treated calli via encapsulation-dehydration after 1 week cultured in callus induction medium. C : control, E-D : cryo-treated calli. Arrow: survived calli.

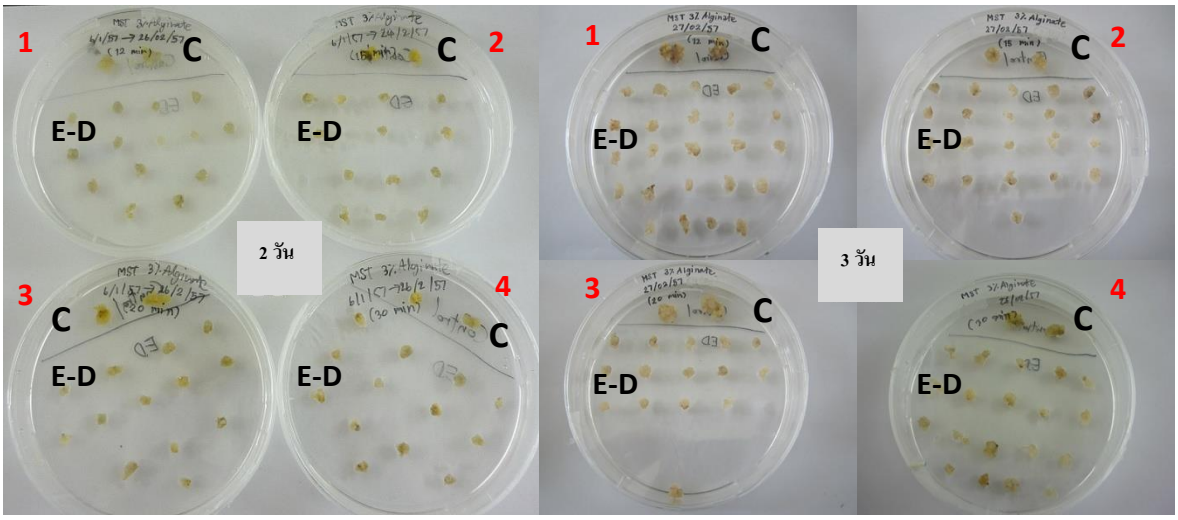


Figure 5. Cryo-treated calli via encapsulation-dehydration using 3% sodium-alginate after 1 week cultured in cullus induction medium. Calli were pre- cultured in 0.75 M sucrose supplemented MS medium for 2-3 days before cryo-treatment. C: control calli. E-D: cryo-treated calli. 1-4: repeating plates.

หลังจากพักฟื้นแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 1 เดือน แล้วย้ายแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี encapsulation-dehydration ไปเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี 0.5 mg/l 2,4-D และ 2 mg/l kinetin เพื่อชักนำให้เกิดต้น อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถชักนำให้แคลลัสเกิดเป็นต้นได้ แม้กระทั่งแคลลัสชุดควบคุม ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากแคลลัสที่นำมาใช้มีอายุมากเกินไป ดังนั้นขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการนำแคลลัสใหม่ที่มีอายุ 1-2 เดือน ซึ่งสามารถนำมาชักนำให้เป็นต้นได้ มาแช่แข็งด้วยวิธี encapsulation-dehydration โดยใช้ 3% sodium-alginate และเลี้ยงใน MS ที่มี 0.75 M sucrose เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว

8.1.2.4. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR

8.1.2.4.1. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจากเนื้อเยื่อแคลลัสและต้นอ้อยในหลอดทดลอง

การตรวจสอบเชื้อไฟโรพลาสมาในแคลลัส โดยสุ่มมา 2 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบชิ้นยีนเฉพาะขนาด 210 bp (ภาพที่ 6) และเมื่อนำแถบขนาดดังกล่าววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบในแคลลัสนั้นมีความเหมือน “Sugarcane white leaf phytoplasma genes” ถึง 99% (ภาพที่ 7) อาจกล่าวได้ว่าสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในแคลลัสในปริมาณต่ำ เนื่องจากพบผลผลิต PCR เฉพาะขนาด 210 bp

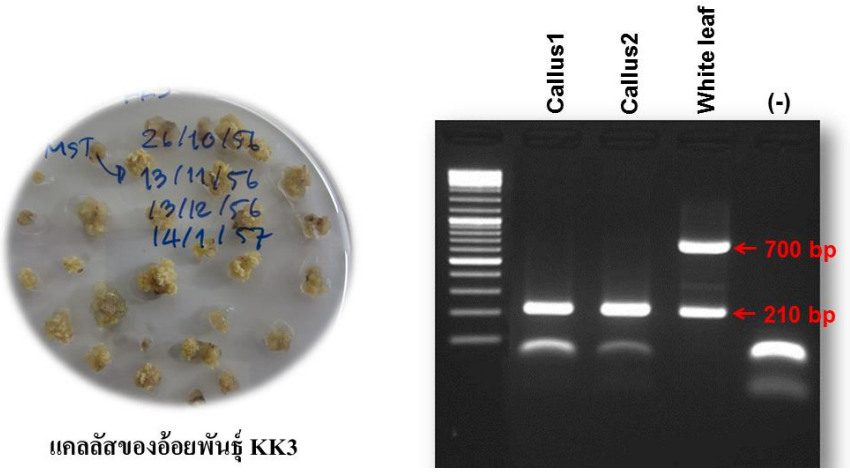
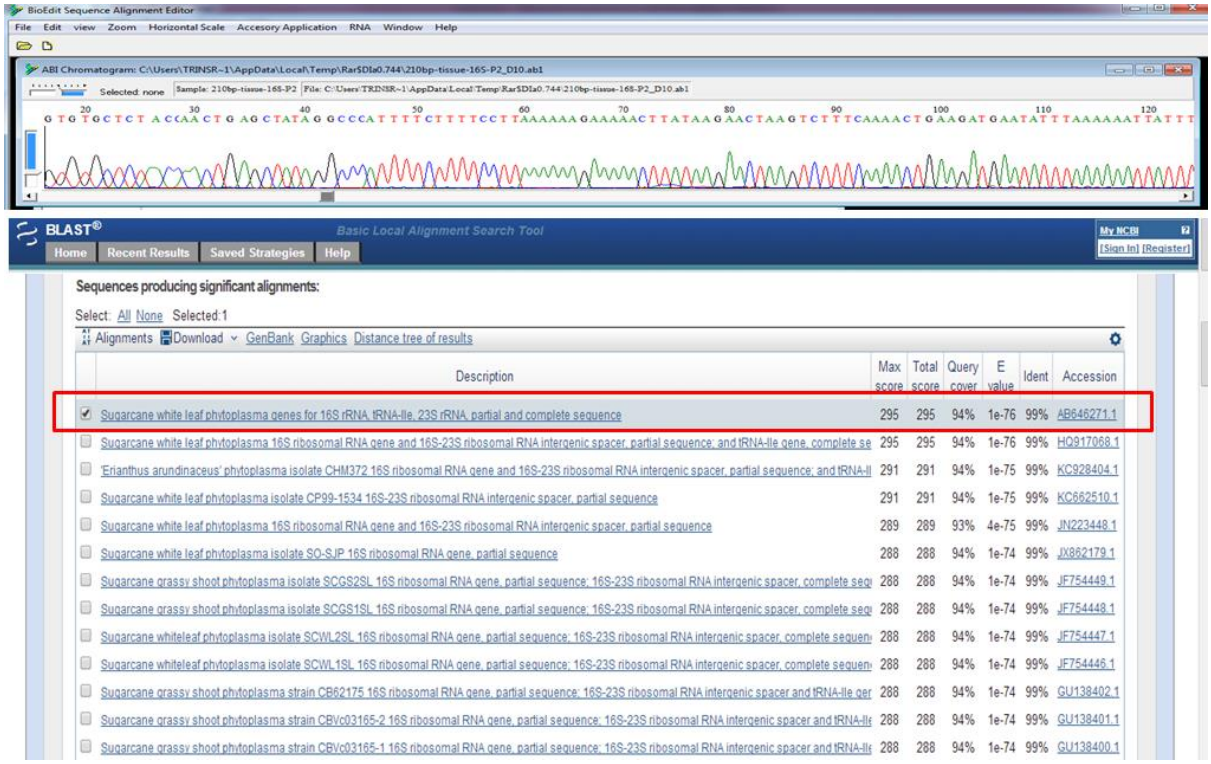


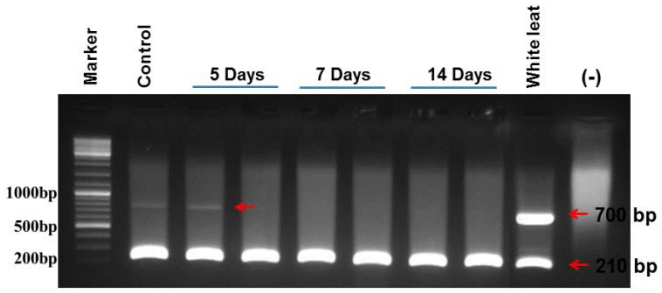
Figure 6. Calli of sugarcane var. KK3 and phytoplasma detection using nested- PCR targeting 16S-23S rDNA gene. Callus 1 and Callus 2 : KK3 calli repeated test samples. White leaf : positive control. (-) : negative control.



ภาพที่ 7แสดงตัวอย่างโครมาโตแกรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนขนาด 210 bpจากแคลลัสอ้อยพันธุ์ KK3 และลำดับนิวคลีโอไทด์มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99% กับ Sugarcane white leaf phytoplasma genes เมื่อblast ในฐานข้อมูล NCBI

สำหรับผลการตรวจหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาของต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่สาร PPM ความเข้มข้น 10 ul/ml เป็นเวลา 5, 7 และ 14 วัน ด้วยเทคนิค nested-PCR พบว่าชุดควบคุมสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตรพลาสมาซึ่งพบแถบขนาด 700 และ 210 bpเมื่อ treat ด้วย PPM เป็นเวลา 5 วัน เพิ่มแถบ 700 และ

210 bp 1ใน2ตัวอย่างที่ศึกษา สำหรับการ treat ด้วย PPM เป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าน่าจะสามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตรพลาสมาได้ เนื่องจากว่าพบเฉพาะขนาด 210 bp (ภาพที่ 8) นอกจากนี้เมื่อนำแถบดีเอ็นเอขนาด 210 bpไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจสอบได้มีความเหมือนกับ “Sugarcane white leaf phytoplasma genes” ถึง 99% (ภาพที่ 9) เช่นเดียวกับที่ตรวจพบในแคลลัส



ภาพที่ 8แสดงการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested- PCR จากต้นอ้อยพันธุ์ KK3 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่สาร PPM ความเข้มข้น 10 ul/ml เป็นเวลา 5, 7 และ 14 วันเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้อยใบขาวที่เป็น positive control (white leaf)

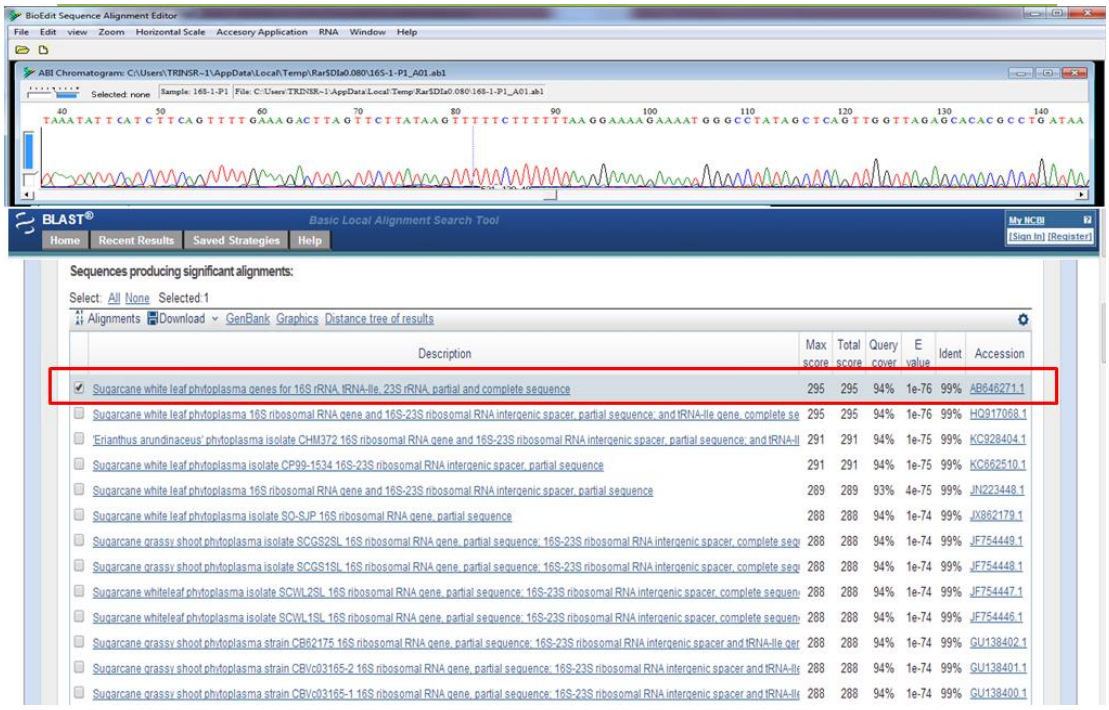
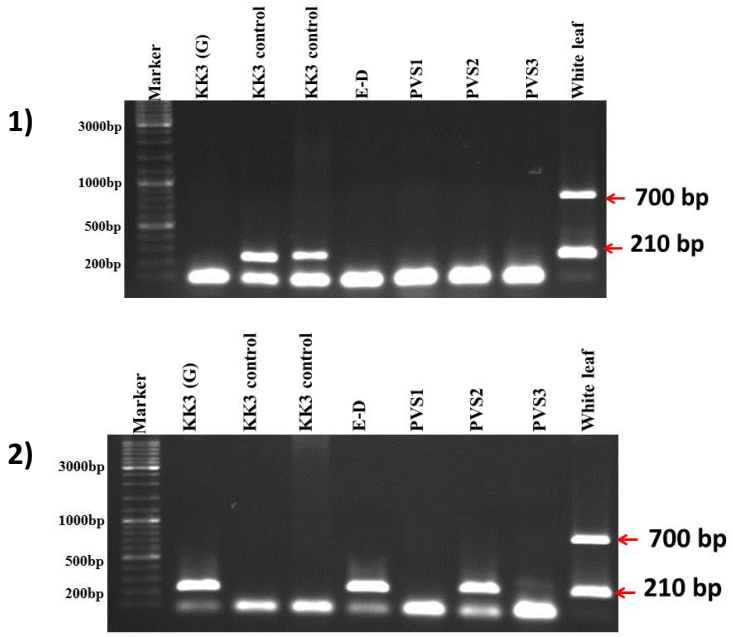


Figure 9. Nucleotide sequences chromatogram of 210 bp DNA fragment of partial 16S-23S rDNA gene of phytoplasma detected in culture of sugarcane var. KK3 and sequence alignment to Sugarcane white leaf phytoplasma genes in NCBI database showing 99% similarity.

8.1.2.4.2. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจากเนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี encapsulation-vitrification และ encapsulation-dehydration

จากการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตรพลาสมาจากเนื้อเยื่อแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีencapsulation-vitrificationและ encapsulation-dehydration แล้วนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค nested-PCR พบว่าทั้งสองวิธีมีแนวโน้มที่สามารถจำกัดเชื้อได้ (ภาพที่ 10 ซ้ำที่ 1) โดยสามารถตรวจพบเชื้อที่ขนาด 210 bpในแคลลัสอ้อยพันธุ์ KK3 (KK3 control) แต่ไม่พบเชื้อในตัวอย่างอ้อยพันธุ์ KK3 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการตรวจสอบว่าปลอดเชื้อและแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีencapsulation-vitrificationและ encapsulation-dehydration เลย คาดว่าวิธีการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีมีแนวโน้มที่สามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาได้

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อทำการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested-PCR อีก 3 ซ้ำ พบว่าการปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 210 bpไม่คงที่ (ภาพที่ 9 ซ้ำที่ 2-4) ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณเชื้อไฟโตรพลาสมาที่มีในตัวอย่างน้อยมาก จึงทำให้ผลการตรวจสอบไม่คงที่ ดังนั้นหากเพิ่มระยะเวลาในการแช่แข็งในไนโตรเจนจาก 12 นาที เป็น 15, 20 และ 30 นาที คาดว่าน่าจะสามารถกำจัดเชื้อไฟโตรพลาสมาได้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแคลลัสที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ เมื่อเทียบกับแคลลัสที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง



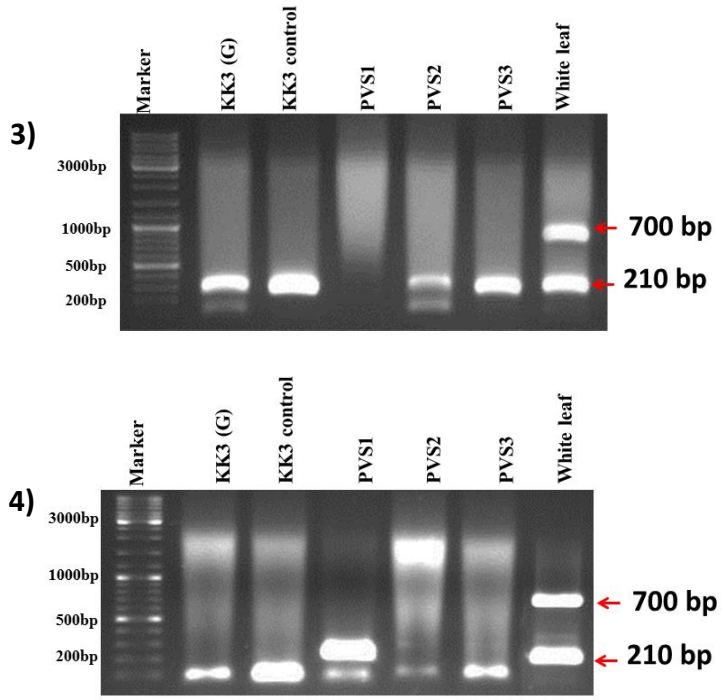


Figure 10. Sugarcane white leaf phytoplasma detection in KK3 calli using nested- PCR. KK3 (G) : leaf of no phytoplasma detectable KK3 plantlet propagated by tissue culture. KK3 control : KK3 calli. E-D : KK3 calli derived fromcryo-treated via encapsulation-dehydration. PVS1, PVS2, PVS3 : KK3 calli derived from encapsulation-vitrification. positive control : white leaf.

การทดลองด้วยการเพิ่มขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างก่อนเข้าสู่การแช่แข็ง โดยการคัดเลือกแคลลัสที่มีลักษณะไม่ฉ่ำน้ำ และมีแบ่งเซลล์ออกมาประมาณ 2-3 อาทิตย์ มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่มี Mannitol ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำแคลลัสมา ผึ่งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ประมาณ 1 เดือน เพื่อพักฟื้น ก่อนย้ายไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดต้น พบว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ทั้งหมด แต่ตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ไม่สามารถชักนำให้เกิดต้นได้ (ภาพที่ 11)

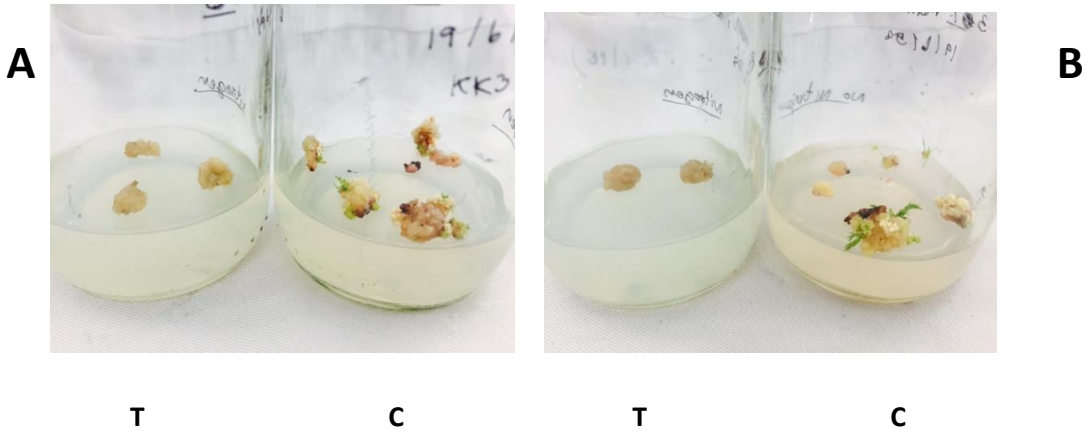


Figure 11. Cryo-treated callus pre-treatment with various manitol concentration. Calli were pretreated with (A) 0% manitol and (B) 3% manitol before 1 hour cryo-treatment, then subjected in shoot induction medium. T : cryo-treated calli. C: control with no cryo-treatment.

9. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

การกำจัดเชื้อไฟโพลาสมาด้วยยาปฏิชีวนะต่างๆ รวมทั้งการใช้สารสกัดธรรมชาติ หรือสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ พบว่าลดปริมาณเชื้อลงได้ แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ สารเหล่านี้บางชนิดทำให้อ้อยตายด้วย ส่วนการแช่แข็งเนื้อเยื่ออ้อยด้วยความเย็นยิ่งยวดนั้นพบว่าการหุ้มด้วยเมล็ดเทียมมีผลอย่างมากต่อความมีชีวิตของเนื้อเยื่อหลังการแช่แข็ง และพบว่าเนื้อเยื่อที่งอกใหม่หลังการแช่แข็งแล้ว มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาลดลงค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับการใช้สารต่างๆ ในการกำจัด แต่มีปัญหาว่าเนื้อเยื่อที่ผ่านการแช่แข็งแล้วไม่สามารถชักนำให้เป็นต้นได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

10.1 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการ สวพ. 3 เรื่องการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาด วันที่ 11 มีนาคม 2558

10.2 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการและเกษตรกร หลักสูตร การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อยโรงงาน จำนวน 2 รุ่น ระหว่างวันที่ 9-11 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และ วันที่ 23-25 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

10.3 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ให้แก่เกษตรจากแหล่งต่างๆ ที่มาดูงานที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ปีงบประมาณ 2558

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานกลุ่มวิจัยโรคใบขาว จากสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร ดร. ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ ผชช. กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ อาจารย์รังสี เจริญสถาพร ที่ให้ข้อมูล และคำปรึกษา ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ที่ร่วมกันดำเนินงานอย่างจริงจัง ทำให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี และสำเร็จตามเป้าหมายเป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

Aldaghi M, Massart S, Druart P, Bertaccini A, Jijakli MH, Lepoivre P. 2008. Preliminary evaluation of antimicrobial activity of some chemicals on in vitro apple shoots infected by 'Candidatus Phytoplasma mali'. Commun Agric Appl Biol Sci. 73(2):335-41.

Askari N, Salehi Jouzani G, Mousivand M, Foroutan A, Hagh Nazari A, Abbasalizadeh S, Soheilivand S, Mardi M. 2011. Evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches' broom disease using real-time PCR. J Microbiol Biotechnol. 21(1):81-8.

Brison M, de Boucaud M. T., Pieronnet A. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum pox potyvirus. Plant Sci. 123, 189–196.

Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: progress and prospects. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 40, 27–433.

Wang, Q.C. and Valkonen, J.P.T. 2008. radication of two synegistically interacting viruses from sweetpotato using shoot tip culture and cryotherapy of shoot tips. J. Virol. Methods 154, 135–145

Wang, Qiaochun andValkonen , Jari P.T. 2009. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. Trends in Plant Science, 14 (3), pp : 119-122.