รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย :วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อย

2. โครงการวิจัย :โครงการวิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย

กิจกรรม :การกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย

กิจกรรมย่อย :-

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย): ผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ):

Effect of sugarcane white leaf phytoplasma concentration and environmental factors on white leaf symptom expression in infected-sugarcane

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ผู้ร่วมงาน นางสาวอัมราวรรณ ทิพยวัฒน์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

นายวีรกรณ์แสงไสย์ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

5. บทคัดย่อ

การแสดงอาการใบขาวในอ้อยพบว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อม แต่ยังขาดข้อมูลระดับของปริมาณเชื้อต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดอาการใบขาวได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อม รวมทั้งขาดข้อมูลพัฒนาการของปริมาณเชื้อเมื่ออ้อยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียด ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว โดยทำการศึกษา 2 วิธีการ คือ (1) การชักนำอาการใบขาวด้วยภาวะร้อนและแล้งเพื่อศึกษาระดับปริมาณเชื้อที่สามารถชักนำอาการใบขาวได้ และ (2) การชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของหน้าดิน โดยใช้อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ติดเชื้อใบขาวระดับต่างๆ กัน การทดลองในสภาพควบคุมใช้สภาวะอุณหภูมิ (33-39°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (60%) ความเข้มแสง (20,000 LUX) และเวลาส่องสว่าง:มืด (14:10 ชม.) ไม่ให้น้ำระหว่างทดสอบเป็นเวลา 2 และ 4 วัน บันทึกอาการของต้นทำการฟื้นต้นหลังการทดสอบในตู้เป็นเวลา 14 วัน ตรวจปริมาณเชื้อด้วยวิธี 16S-23S rDNA nested PCR และ secA gene พบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตั้งแต่ 100 copy/µl ในดีเอ็นเออ้อย 25 ng สามารถชักนำอาการใบขาวในอ้อยได้ ปริมาณเชื้อ 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม และระดับปริมาณเชื้อที่ 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัมหรือน้อยกว่า (รหัสสีส้มระดับ 1) พบว่าไม่สามารถชักนำอาการใบขาว การทดสอบในต้นที่มีเชื้อน้อยกว่า 0.5 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ถึงน้อยกว่า 10 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng พบว่าหน่อใหม่ที่งอกมีสีเขียวและมีเชื้อในระดับน้อยกว่า 0.5-0.9 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng ส่วนในต้นที่มีเชื้อในระดับเกือบถึง 1 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng หน่อใหม่ที่

ได้จะมีในตั้งแต่ 0.5 – 1 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng แสดงให้เห็นว่าหน่อใหม่ของกลุ่มที่มีเชื้อสีเขียวระดับ 3 อาจมีการเพิ่มปริมาณเชื้อในรุ่นหน่อ ส่วนกลุ่มที่มีเชื้อระดับ 1 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng จะให้หน่อเป็นต้นใบขาว การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีในกลุ่มที่ติดเชื้อใบขาวระดับสูง พบว่ากิจกรรมเอ็นไซม์ APX, ปริมาณสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโปรตีนรวม มีค่าแตกต่างกัน การทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของหน้าดินที่ได้จากชุดดินวารินและกำแพงแสนโดยใช้ต้นที่มีปริมาณใบขาวสูง พบว่าต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินวาริน. มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดอาจมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นได้ ในการทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของดิน ได้ทำการเพาะอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่ปลูกในแหล่งดินชนิดอื่น เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ โดยการปลูกเปรียบเทียบในชุดดินเดิมและชุดดินวารินที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (ท่าพระ) ทำการปลูก 5 แหล่ง ได้แก่ ศวพ. บุรีรัมย์ แปลงเกษตรกรที่ลำปลายมาศ ศวพ.สุรินทร์ ศวพ.โนนสูง และ ศวพ. ศรีษะเกษ ผลการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวจากใบของลำที่นำมาจากแหล่งต่างๆ นั้นพบว่ามีเชื้อใบขาวตั้งแต่ 0.5-10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม พบว่าไม่แสดงอาการใบขาวในอ้อยปลูก

6. คำนำ:

การแสดงอาการใบขาวในอ้อยพบว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อม โดยพบว่าอ้อยที่มีปริมาณเชื้อมากแต่ยังไม่แสดงอาการใบขาว จะแสดงอาการได้หากถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และพบว่าสภาวะแล้ง การขาดน้ำ ทำให้อ้อยเกิดภาวะเครียด และหลังจากฟื้นตัวจากการได้รับน้ำแล้วพบว่าหลายต้นแสดงอาการใบขาว และยังพบอีกว่ากลุ่มที่แสดงอาการใบขาวเหล่านี้ บางต้นใบที่เคยขาวแล้ว สามารถกลับเขียวคืนได้อีก ส่วนต้นที่แสดงอาการใบขาวตั้งแต่เริ่มงอก จะไม่สามารถฟื้นคืนได้และตายในที่สุด (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2558ข) แสดงให้เห็นถึงตัวแปรสองชนิดที่แยกกัน คือ ปริมาณเชื้อ และการแสดงอาการใบขาว ซึ่งอาจมีสภาวะเครียดที่เกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นตัวเชื่อมให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรนี้ โดยที่พืชอาจมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อความเครียดที่ใช้ควบคุมการแสดงอาการหรือปริมาณเชื้อได้ในระดับหนึ่งจากการสังเกตพบว่าในปีที่มีช่วงแล้งนานกว่าปกติ จะเกิดใบขาวมากและกลุ่มดินทรายมักพบต้นที่มีอาการใบขาวได้มากกว่าในกลุ่มดินที่มีความอุดมสมบูรณ์มากกว่า แม้บางต้นจะมีปริมาณเชื้อสูงเช่นกันจากการศึกษาของ กอบเกียรติและคณะ (2554) ที่ดำเนินการที่แปลงทดลองในศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น โดยใช้พันธุ์ขอนแก่น 3 พบว่ากลุ่มต้นอ้อยที่ไม่ให้น้ำแสดงอาการใบขาวมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำ แม้ในกลุ่มต้นที่ไม่มีอาการใบขาวจะมีปริมาณเชื้อสูงใกล้เคียงกับต้นที่แสดงอาการใบขาวก็ตามและจากการผลศึกษาของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558ข) พบว่าต้นอ้อยที่แสดงอาการใบขาว มีค่าสารโพรลีนสูงมากเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่แสดงอาการ แสดงให้เห็นว่าอ้อยใบขาวแสดงสภาวะosmotic stress ร่วมด้วย จากข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมมีส่วนมากในการกระตุ้นให้เกิดอาการใบขาวและจากการผลศึกษาเบื้องต้นของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558ข) พบว่า อ้อยที่ติดเชื้อใบขาว ทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการมีการสร้างสารต่างๆ ที่แสดงถึงเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นขึ้นในระดับต่างกัน อ้อยที่ติดเชื้อใบขาวมีการสร้างอนุมูลอิสระกลุ่ม Reactive oxygen species

(ROS) ขึ้นเพื่อกำจัดเชื้อ รวมทั้งปฏิกิริยาต่อต้านอื่นอีกเช่น การสร้างสารประกอบฟีนอลิกส์ และคัลโลส เพื่อกำจัดและยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อภายในพืช

ความสามารถของปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าเหล่านี้น่าจะขึ้นอยู่กับพันธุกรรมด้วย โดยจากการสังเกตพบว่าหน่อของอ้อยป่า (*S. Spontaneum*)ที่แสดงอาการใบขาว จะไม่พัฒนาเป็นลำ หน่อที่มีใบขาวจะเหี่ยวตายอย่างรวดเร็ว ซึ่งแสดงถึงภาวะ Hypersensitive response (HR) ที่พืชชนิดนี้สร้างขึ้นเพื่อจำกัดการกระจายตัวของเชื้อรวมทั้งกำจัดเชื้อทิ้งไปด้วยการทำให้เซลล์ตายอย่างรวดเร็วในขณะที่ลูกผสมระหว่างอ้อยปลูก (*S. officinarum*) และอ้อยป่าแสดงอาการใบขาวชัดเจนทั้งนี้มีรายงานว่าพืชแต่ละชนิดมีความอ่อนแอต่อปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาแตกต่างกัน ในพืชที่อ่อนแอปริมาณเชื้อน้อยอาจทำให้แสดงอาการได้อย่างรุนแรง จากรายงานการทดลองต่อกิ่งพันธุ์แอปเปิลที่อ่อนแอต่อเชื้อโตพลาสมาเข้ากับต้นตอพันธุ์ทนโรคพบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาในกิ่งพันธุ์ที่อ่อนแอมีปริมาณลดลงหรือไม่ได้เพิ่มปริมาณมากขึ้นจากเดิม โดยพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีส่วนช่วยในการลดความรุนแรงของเชื้อนี้ (Musetti et al., 2005) Roggia et al. (2014)รายงานว่าต้นองุ่นที่มีความไวต่อการเกิดโรคต่างกันมีปริมาณเชื้อในต้นต่างกันด้วย โดยพันธุ์ Barberaมักพบว่ามีปริมาณเชื้อนี้สูงกว่าพันธุ์ Nebbioloและการติดเชื้อ grapevine yellows phytoplasma, bois noir ซึ่งเป็นไฟโตพลาสมาใน subgroup 16SrXII-A ซ้ำซ้อนในต้นเดียวกัน ไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อ Flavescencedoreephytoplasma (FDP) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาFDPในองุ่นเหล่านี้มีปริมาณสูงในช่วงฤดูร้อนและต่ำในช่วงฤดูใบไม้ผลิ และปริมาณเชื้อนี้มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของอาการที่แสดงออกในช่วงฤดูใบไม้ผลิเช่นเดียวกับ Martini et al. (2010) ซึ่งได้ทำการศึกษาในส่วนของการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา โดยพบว่าเชื้อ Ca. *P. prunorum*ใน *Prunus* speciesมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นในฤดูที่มีการเจริญเติบโตมาก (vegetative season)และการแสดงอาการของโรคขึ้นกับระดับปริมาณเชื้อด้วย

จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่า สภาพแวดล้อม พันธุกรรม และปริมาณเชื้อมีผลต่อการแสดงอาการของโรคในพืช ในส่วนของอ้อยและโรคใบขาวอ้อยนั้น ซึ่งแม้พบว่าการแสดงอาการของโรคเกิดจากปฏิสัมพันธ์ขององค์ประกอบที่กล่าวมา แต่ยังขาดข้อมูลระดับของปริมาณเชื้อต่ำที่สุดที่ทำให้เกิดอาการใบขาวได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อม โดยคาดว่าหากมีเชื้อในปริมาณต่ำกว่าระดับที่สามารถถูกกระตุ้นด้วยสภาวะเครียดนี้แล้ว อ้อยที่ติดเชื้อใบขาวในระดับต่ำกว่าระดับวิกฤตินี้ น่าจะให้ผลผลิตได้อีกหลายรุ่นกว่าปริมาณเชื้อจะสะสมถึงขั้นวิกฤติที่ทำให้แสดงอาการใบขาวได้นอกจากนี้ยังขาดข้อมูลพัฒนาการของปริมาณเชื้อเมื่ออ้อยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ทำให้เกิดความเครียดอีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโจทย์ดังกล่าวนี้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อขบวนการผลิตและการคาดการณ์ผลผลิตที่ควรจะได้ ที่รวมตั้งแต่การวางแผน การคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์ การขยายพันธุ์การคัดเลือกแปลงปลูกนอกจากนี้ยังอาจเป็นแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์ทนโรคได้

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์: เครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสง เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม อุปกรณ์ดูดจ่ายสารละลาย เครื่องปั่นเหวี่ยง หลอดขนาด 1 มล. เครื่องตรวจดีเอ็นเอ เครื่องแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า กระถางพลาสติก ดินสำหรับเพาะต้นกล้าตู้ควบคุมการเจริญเติบโต

ตัวอย่างพืช : อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้จากกอที่มีและไม่มีอาการใบขาว

วิธีการ :

ขั้นตอนที่ 1 การตรวจหาระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่ชักนำให้เกิดอาการใบขาวได้โดยทดสอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิและสภาพแวดล้อม

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยอายุประมาณ 2 เดือนที่เพาะจากลำอ้อยที่มีอาการใบขาวที่ยอดหรือหน่อไม่มีอาการใบขาวและจากลำที่มาจากกอที่ไม่มีอาการใบขาว จำนวนไม่ต่ำกว่า 2 พันธุ์

แบบและวิธีการทดลอง-

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ในแต่ละพันธุ์ นำอ้อยอาการระดับต่างๆ ชนิดละไม่ต่ำกว่า 10 ลำ นำมาตัดข้อ แช่ข้ออ้อยที่ได้ในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วนำมาเพาะตัวอย่างที่คัดเลือกได้ในกระบะทราย ให้น้ำตามสภาพความชื้นของดินเพาะในกระบะจนอายุ 2 เดือน บันทึกอาการต้นที่งอก คัดเลือกเฉพาะต้นที่ไม่มีอาการใบขาว จำนวนไม่ต่ำกว่า 50 ต้น ต่อพันธุ์ ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีการของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558ก) ตรวจปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการต่อต้านภาวะการติดเชื้อ ตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558ข) นำตัวอย่างมาทดสอบสภาวะแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต โดยควบคุมอุณหภูมิ (33-39°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (60%) ความเข้มแสง (20,000 LUX) และเวลาส่องสว่าง:มืด (14:10 ชม.) ไม่ให้น้ำระหว่างทดสอบเป็นเวลา 4 วัน บันทึกอาการของต้นทำการฟื้นต้นหลังการทดสอบในตู้เป็นเวลา 3-14 วัน ด้วยการให้น้ำ และบันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาวตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR ในกลุ่มต้นที่แสดงอาการใบขาวและปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการต่อต้านภาวะการติดเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 การสำรวจปริมาณเชื้อโรคใบขาวในต้นอ้อยในแปลงเกษตรกรสภาพดินต่างๆ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในแปลงเกษตรกร (เก็บตัวอย่างอ้อยและข้อมูลสภาพแวดล้อมจากชุดโครงการวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อยโดยการจัดการน้ำ ธาตุอาหารและการใช้พันธุ์ที่เหมาะสมกับพื้นที่)

แบบและวิธีการทดลอง : -

วิธีปฏิบัติการทดลอง

สำรวจอ้อยตอในแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบขาวอย่างรุนแรงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และ ภาคเหนือตอนล่าง เก็บตัวอย่างลำและใบ ทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ บันทึกข้อมูลสภาพดิน สภาพแวดล้อมอื่น ตรวจปริมาณเชื้อและการติดเชื้ออื่นด้วย PCR ในใบก่อนการเพาะและชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาตามวิธีการของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558ก) และตรวจชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิเคราะห์ลำดับเบส

เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล นำลำที่สำรวจได้ มาเพาะข้อ (แยกลำ) และบันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาวในต้นที่งอกใหม่เพื่อยืนยันการติดเชื้อและปริมาณเชื้อใบขาว

ขั้นตอนที่ 3 เปรียบเทียบผลระหว่างการศึกษาปริมาณเชื้อในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร

ขั้นตอนที่ 4 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล :

1. จำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาวหลังการทดสอบในตู้ควบคุม ระดับความรุนแรงของอาการใบขาวและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาจากใบ
2. ข้อมูลผลการตรวจปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการต่อต้านภาวะการติดเชื้อในต้นที่ทดสอบ
3. ข้อมูลสภาพแวดล้อมของตัวอย่างที่สำรวจได้ ประวัติการนำท่อนพันธุ์มาปลูก อาการต้นที่เพาะจากอ้อยที่ได้จากแหล่งปลูกต่างๆ และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา

เวลาและสถานที่ : ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2558 – กันยายน 2562

สถานที่ดำเนินการทดลอง: ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดสอบปริมาณเชื้อและการชักนำอาการใบขาวด้วยสภาวะแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต

จากการเพาะกล้าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณสูงระดับสีเหลือง (น้อยกว่า 10 เซลล์ ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม) ในกระบะทราย อายุประมาณ 4 สัปดาห์ ทำการทดสอบในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต ที่ควบคุมสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิ 33 °C ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 55% RH ความเข้มแสง 20,000 LUX และการส่องสว่าง 14/10 ชั่วโมง (สว่าง/มืด) ทำการทดสอบชุดละ 10 ต้น เป็นเวลานาน 2 วัน และ 4 วัน จากนั้นทำการตรวจการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ผลการตรวจการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีจำนวน 9 ชนิด พบว่า กิจกรรมเอ็นไซม์ในกลุ่ม oxidative stress ได้แก่ Ascorbate peroxidase (APX) และ Guaicol peroxidase (GPX) มีปริมาณสูงขึ้น1-2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบ เช่นเดียวกับสารในกลุ่มที่แสดงถึงการทำลายของเซลล์ ได้แก่ Malondialdehyde (MDA) และกลุ่มที่แสดงถึงภาวะปัญหาความเต่งของเซลล์ (osmotic stress) ได้แก่ Proline ในกลุ่มการสังเคราะห์แสงพบว่า คลอโรฟิลล์มีปริมาณต่ำลง 1-2 เท่าและน้ำตาลรวมมีปริมาณสูงขึ้น 2-4 เท่า ในขณะที่แป้งและสารประกอบฟีนอลิกส์ไม่แตกต่างกันเด่นชัด ส่วนปริมาณโปรตีนรวมสูงขึ้นในวันที่ 2 และลดลงในวันที่ 4 ที่ทดสอบ (Fig.1) แสดงถึงภาวะที่ระบบการทำงานของเซลล์ถูกทำลาย การทดลองฟื้นต้นหลังจากทดสอบในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตพบว่าไม่ประสบความสำเร็จ อาจเนื่องมาจากความแข็งแรงของต้นก่อนทดสอบ รวมทั้งไม่พบการแสดงอาการใบขาว แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อในต้นในระดับนี้ไม่สามารถทำให้ต้นแสดงอาการใบขาวได้ รวมทั้งพบว่าปริมาณน้ำตาลที่มีค่าสูงขึ้นกว่าต้นควบคุม ซึ่งเป็นอาการปกติของอ้อยที่ถูกทดสอบในภาวะร้อนและขาดน้ำ โดย

พบว่าในกรณีของต้นที่ติดเชื้อใบขาวในปริมาณสูงและมีการแสดงอาการใบขาวแล้ว จะมีการสะสมแป้งในใบและมีปริมาณน้ำตาลที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากมีการสังเคราะห์แสงที่น้อยลง จากคลอโรฟิลล์ที่ถูกทำลาย (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2558ข)

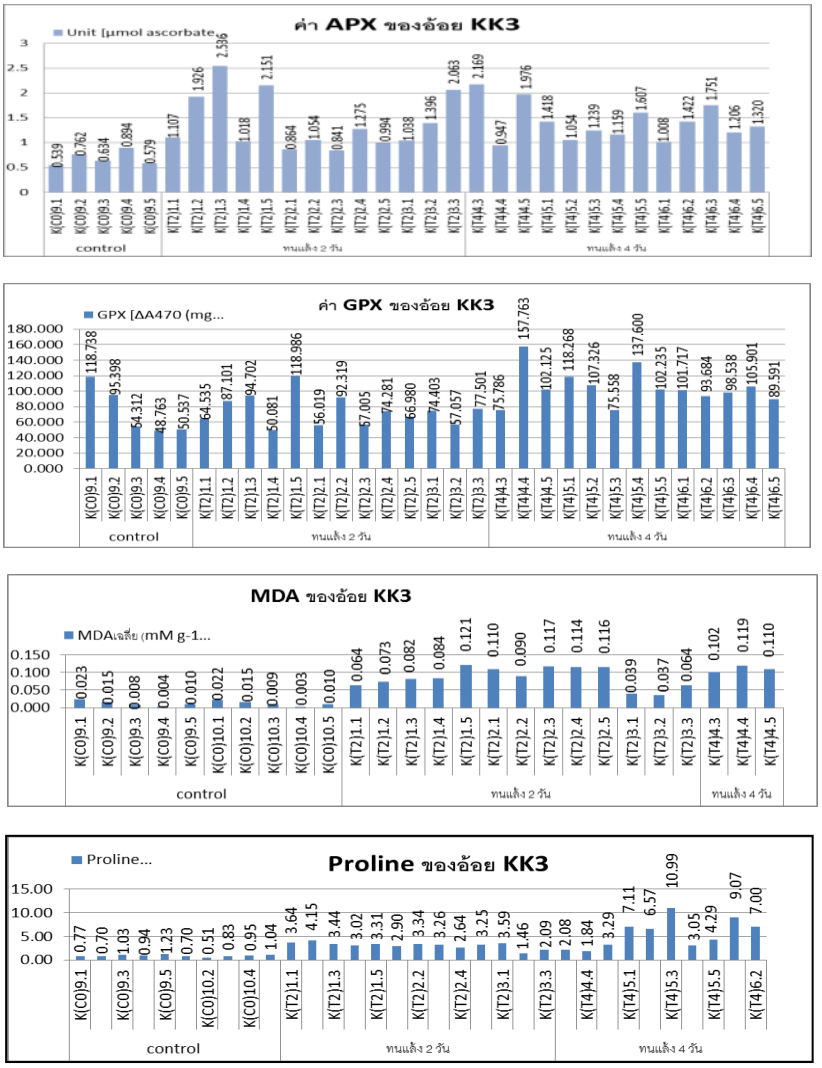

Figure 1. Diagramatic illustration of biochemical components changes in sugarcane seedlings var. KK3 derived from white leaf infected seedcanes ages 4 weeks old at 2 and 4 days post-treatment in the control environment chamber conditioned with 33 °C temperature, 55% RH, 20,000 LUX light density, 14/10 hrs light/dark periods, no water. APX : ascorbate peroxidase, GPX: guaicol peroxidase, MDA : malondialdehyde. Control : non-treatment with normal watering.

การทดสอบชักนำอาการใบขาวซ้ำ ดำเนินการในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงเกษตรกรที่ปลูกจากอ้อยชำข้อรุ่นที่ 3 ที่เริ่มจากใช้อ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คัดเลือกลำจากกอที่มีอาการใบขาว นำมาเพาะในกระบะทราย ให้น้ำ ตามความชื้นดิน และสารอาหาร (Hoagland solution) ตามน้ำหนักกระถาง สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ดำเนินการทดสอบเมื่อต้นอายุได้ประมาณ 2 เดือนนับจากวันเพาะก่อนทดสอบในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต ทำการ

ตรวจปริมาณแป้ง น้ำตาล และคลอโรฟิลล์ ในใบ ทั้งนี้ไม่สามารถตรวจปฏิกิริยาชีวเคมีอื่นได้เนื่องจากใบมีจำนวนน้อย ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา และบันทึกอาการใบขาวก่อนทดสอบ ทำการทดสอบสภาวะแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลา 4 วัน ตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น จากนั้นนำต้นที่ทดสอบทำการฟื้นสภาพด้วยการให้น้ำ และบันทึกอาการใบขาวหลังจากใบคลี่แล้วจากการให้น้ำตัวอย่างชุดควบคุมดำเนินการเช่นเดียวกัน แต่ไม่ได้นำเข้าทดสอบในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต

Table 1. White leaf disease phytoplasma concentration based on 16S-23S rDNA nested-PCR and secA gene detection methods in Leaf of sugarcane var. KK3 seedlings derived from white leaf infected seed canes at pre-treatment and leaf color at 5 and 90 days post-treatment in the control environment chamber conditioned with 33 °C temperature, 55% RH, 20,000 LUX light density, 14/10 hrs light/dark periods, no water. G : green, WG : white and green, W : white

	Phytoplasma concentration cells/µl in 25 ng plant DNA				Leaf no. / symptom 5 days post treatment					90 days post treatment
No.	concentration	700 bp	210 bp	SecA	1	2	3	4	5	
1inT1	100,000	4+	4+	4+	WG/D	WG/D	WG/WG	W/W	W/W	dry
1inT2	10,000	4+	4+	3+	WG/D	WG/D	WG/W	WG/W	W/W	dry
1inT3	100,000	4+	4+	4+	WG/D	WG/D	WG/WG	WG/W	W/W	dry
1inT4	100,000	4+	4+	4+	WG/D	WG/D	WG/W	W/W	-	dry
2inT1	10	1+	4+	3+	G/D	G/G	G/D	G/D	G/WG	dry
2inT2	10	0.5+	4+	1+	G/D	G/D	G/D	G/G	G/WG	dry
2inT3	<10	-	4+	+/-	D/D	G/D	G/G	G/G	-	dry
2inT4	<10	1+??	4+	2+	G/D	G/G	G/G	G/G	G/G	dry
3inT1	1000	3+	4+	3+	D/D	G/D	G/D	G/WG	G/WG	dry
3inT2	10	1+	4+	<0.5+	G/D	G/D	G/D	G/WG	G/WG	dry
3inT3	<10	-	4+	+/-	G/D	G/WG	G/WG	G/WG	-	dry
3inT4	100	2+	4+	3+	G/D	G/WG	G/-	-	-	dry
3inT5	1000	4+	4+	2+	G/G	G/WG	WG/W	WG/W	-/W	dry
4inT1	100,000	4+	4+	4+	G/D	G/WG	G/WG	G/WG	G/WG	dry
4inT2	10	0.5+	4+	1+	G/D	G/D	G/D	G/D	-	shoot GW
4inT3	1000	3+	4+	3+	G/WG	G/WG	G/WG	G/WG	G/WG	dry ตาย
4inT4	<10	-	4+	+/-	G/G	G/D	G/-	-	-	shoot G

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อในจำนวน 18 ต้น ที่ได้จาก 4 ลำ พบว่าตัวอย่างเกือบทั้งหมดมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณสูงระดับสีส้มถึงสีแดง ตั้งแต่ 10-1000 เซลล์ ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัมเกือบทั้งสิ้น (Table 1) ซึ่งเป็นระดับที่สามารถชักนำอาการใบขาวได้ด้วยภาวะเครียด ก่อนทดสอบมีต้นที่แสดงอาการใบขาวแล้ว 5 ต้น และต้นที่ไม่มีอาการใบขาว 13 ต้น หลังการทดสอบด้วยสภาวะแล้ง และฟื้นสภาพต้นด้วยการให้น้ำ เป็นเวลา 3 วัน พบว่าในจำนวนที่ไม่มีอาการใบขาวเริ่มต้น มี 8 ต้น ที่มีใบแสดงอาการใบขาว (ภาคผนวก Table 1) แสดงให้เห็นถึงระดับปริมาณเชื้อดังกล่าวนี้สามารถชักนำอาการใบขาวด้วยสภาวะแล้งได้ การบันทึก

อาการเมื่อต้นมีอายุได้ 90 วัน หลังการฟื้นต้น พบว่าต้นที่มีอาการใบขาวก่อนและหลังทดสอบแห้งตายทั้งหมด แต่มี 1 ต้นที่ไม่มีอาการใบขาวทั้งก่อนและหลังทดสอบมีการงอกหน่อใหม่ 2 หน่อ และแสดงอาการใบขาว โดยต้นนี้มีเชื้อในระดับสีเหลือง หรือน้อยกว่า 10 เซลล์ ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ส่วนอีก 1 ต้นมีการแตกหน่อใหม่เช่นกัน แต่ไม่มีอาการใบขาว พบว่ามีเชื้อในระดับสีเหลืองหรือเขียว หรือประมาณ 1 ถึง <10 เซลล์ ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม (Table 1)

Table 2 biochemical components changes in sugarcane seedlings var. KK3 derived from white leaf infected seed canes ages 4 weeks old at 2 and 4 days post-treatment in the control environment chamber conditioned with 33 °C temperature, 55% RH, 20,000 LUX light density, 14/10 hrs light/dark periods, no water. APX : ascorbate peroxidase, GPX: guaicol peroxidase, MDA : malondialdehyde. Control : non-treatment with normal watering

Biochemical substances	Sample set	average (mg/g FW)	
		Test	Control
Chlorophyll	1	0.30	0.29
	2	0.54	0.41
	3	0.66	0.39
	4	0.61	0.69
Total sugar	1	1.20	1.32
	2	1.65	1.45
	3	0.69	0.90
	4	0.94	1.31
Total starch	1	3.30	3.21
	2	3.51	4.31
	3	3.81	4.66
	4	4.68	4.12

การทดสอบชักนำอาการใบขาวซ้ำ ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงเกษตรกรที่ปลูกจากอ้อยชำข้อรุ่นที่ 3 ที่เริ่มจากใช้อ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คัดเลือกลำจากกอที่มีอาการใบขาว นำมาเพาะในกระบะทรายจำนวน 30 ต้น ทำการตรวจกิจกรรมเอ็นไซม์ APX ปริมาณสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และปริมาณเชื้อใบขาวก่อนการทดสอบชักนำสภาวะเครียด ผลการตรวจค่า APX พบว่าไม่แตกต่างกันมากในจำนวนต้นที่ตรวจสอบ โดยมีค่าเฉลี่ยที่ 0.75 ± 0.23 unit (µmol ascorbate /mg protein/ min) แต่พบว่ามีค่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แตกต่างกันแบ่งเป็น 2 กลุ่มค่อนข้างชัดเจน โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ 1-1 ถึง 3-5 มีค่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูง มีค่าเฉลี่ย 63.58 ± 6.23 mg/L ส่วนตัวอย่างที่ 4-1 ถึง 6-5 มีค่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่ำกว่า มีค่าเฉลี่ย 35.11 ± 2.87 mg/L (Fig. 1)

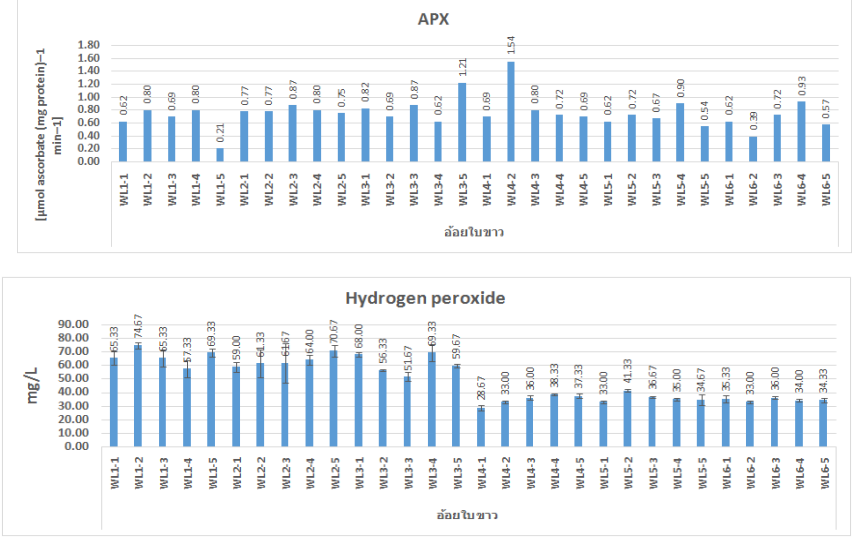

Figure 1. APX enzyme activities and hydrogen peroxide concentrations in sugarcane var KK3 seedlings KK3 derived from white leaf infected seed canes ages 4 weeks old set 1-6 at pre-treatment in the control environment chamber

เมื่อทดสอบในกลุ่มตัวอย่างเพิ่ม ตัวอย่างที่ 7-20 (WL7-1 ถึง WL20-4) พบค่า APX สูงขึ้นในกลุ่มตัวอย่าง 10-16 (WL10-1 ถึง WL16-4) (Fig.2) มีค่าเฉลี่ยรวมทั้งหมด ตั้งแต่ตัวอย่างที่ 1-20 (WL1-1 ถึง WL20-4) เป็น 1.22 ± 0.44 unit (µmol ascorbate /mg protein/ min) ซึ่งเป็นค่าที่สูงขึ้น

ในส่วนค่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลุ่มตัวอย่างที่ 4-6 (WL4-1 ถึง WL6-5) พบว่ามีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นโดยทั้งหมด 20 กลุ่มตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 82 ต้น มีค่าสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เฉลี่ยที่ 61.97± 18.46 mg/L ส่วนโปรตีนรวม พบว่ากลุ่มตัวอย่าง 10-15 (WL10-1 ถึง WL15-5) มีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่น โดยทั้งหมด 20 กลุ่มตัวอย่าง มีค่าโปรตีนรวมเฉลี่ยที่ 7.54± 1.44 mg/g FW (Fig.2)

การตรวจปริมาณเชื้อใบขาวก่อนทดสอบในตู้ควบคุมนั้น พบว่าตัวอย่างทั้งหมด 78 ตัวอย่างที่ทดสอบ ซึ่งเป็นพันธุ์ขอนแก่น 3 นั้น พบว่ามีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับไม่เกิน 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม โดยมีจำนวน 5 ตัวอย่าง มีปริมาณเชื้อในระดับ 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ซึ่งเป็นระดับที่สามารถชักนำอาการใบขาวได้ แต่ผลการฟื้นต้นหลังเพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสีใบหลังการชักนำอาการใบขาวด้วยสภาวะเครียดในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต พบว่ากลุ่มตัวอย่าง 10-15 แห้งตาย ส่วนกลุ่มตัวอย่าง 1-9 และ 16-18 สามารถฟื้นได้ แต่ไม่แสดงอาการใบขาว แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อในระดับ 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ยังไม่สามารถชักนำอาการใบขาวได้ ตัวอย่าง 19-20 เป็นการทดลองเพิ่มในพันธุ์ LK92-11 จำนวน 8 ต้น ในต้นที่อายุประมาณ 5-7 เดือน พบว่ามีเชื้อในระดับ 10-100,000 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม มีต้นที่มีปริมาณเชื้อสูงจำนวน 4 ต้น (ภาคผนวก Table 2) การบันทึกอาการต้นที่ทดสอบด้วยสภาวะแล้งในตู้ควบคุมพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่มีเชื้อในระดับ 10 copy/µl in 25 ng plant DNA หรือน้อยกว่า ส่วนตัวอย่างที่ 16-1 ถึง

20-4 ต้นตายก่อนทดสอบ พบว่าระดับปริมาณเชื้อที่ 10 copy/ul in 25 ng plant DNA หรือน้อยกว่า (รหัสสีส้มระดับ 1) พบว่ายังไม่สามารถชักนำอาการใบขาวได้

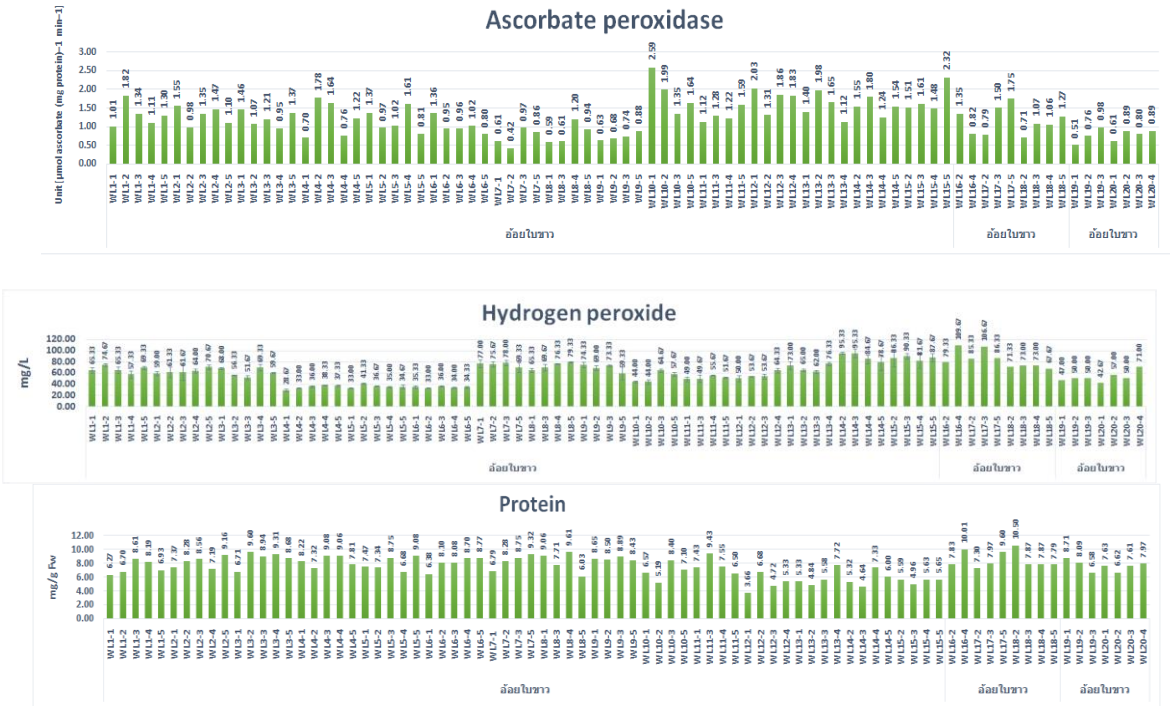

Figure 2. APX enzyme activities and hydrogen peroxide concentrations in sugarcane var KK3 seedlings KK3 and LK92-11 derived from white leaf infected seed canes ages 4 weeks old set 1-6 at pre-treatment in the control environment chamber**.** WL1-1 to WL18-5 : KK3; WL19-1 to WL20-4 : LK92-11

การตรวจปริมาณเชื้อในต้นที่ทดสอบชุดใหม่ ทำการตรวจปริมาณเชื้อก่อนการเข้าตู้ทดสอบ และตรวจสีใบหลังฟื้นต้น และปริมาณเชื้อในหน่อ พบว่าตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้งสิ้น 68 ต้น ก่อนเข้าตู้ทดสอบมีสีใบสีเขียว หลังการทดสอบมีความชื้นลดลงจากเริ่มต้นประมาณ 14-18 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเชื้อใบขาวในระดับสีฟ้า (<0.5 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ถึงสีเหลืองระดับ2 (<10 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) หลังฟื้นต้น มีจำนวน 5 ต้นที่งอกหน่อใหม่ โดยทั้งหมดมาจากต้นที่มีเชื้อในระดับสีฟ้า (<0.5 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ถึงสีเขียวระดับ 3 (>0.5-<1 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ผลการตรวจปริมาณเชื้อในหน่อใหม่พบว่ากลุ่มที่มีสีฟ้าและสีเขียวในระดับ 1-2 จะมีปริมาณเชื้อในหน่อใหม่ในระดับสีฟ้า ส่วนในต้นที่มีเชื้อในระดับสีเขียวระดับ 3 หน่อใหม่ที่ได้จะมีในระดับสีฟ้าและสีเหลืองระดับ 1 (1 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) แสดงให้เห็นว่าหน่อใหม่ของกลุ่มที่มีเชื้อสีเขียวระดับ 3 อาจมีการเพิ่มปริมาณเชื้อในรุ่นหน่อ ซึ่งจากการทดลองเพิ่มพบว่าในสีเหลืองระดับ 1 นี้ จะให้หน่อเป็นต้นใบขาว

2. การทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของดิน

การทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของดิน มีการดำเนินการแล้ว 3 ครั้ง โดยเริ่มปลูกในช่วง ก.พ 2558 ใช้ลำพันธุ์ LK 92-11 ที่มีอาการใบขาวที่ยอด นำมาเพาะข้อตา และทดสอบในหน้าดินจากชุดดินวาริน ที่เก็บจากแปลงใน ศวร. ขก. และหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน ที่เก็บจากบ้านรางโพธิ์ อ. อู่ทอง จ. สุพรรณบุรี ครั้งที่ 2 ใช้อ้อยจากเขาสวนกวางที่มีอาการใบขาวเขียว การทดลองครั้งที่ 1 อ้อยพันธุ์ LK92-11 มีอาการใบขาว ทำการเพาะข้อ แยกลำ ปลูกทดสอบในหน้าดิน จากชุดดินวาริน และดินผสมสำเร็จ (ดินผสมใบก้ามปู) พบว่าต้นที่เพาะได้ส่วนใหญ่มีอาการใบขาวแล้ว จึงไม่มีการทดสอบต่อ

การทดลองครั้งที่ 2 เพาะข้ออ้อยที่ได้จากลำมีอาการยอดขาวและไม่มีอาการจำนวน 9 ลำ แบ่งทดสอบพัฒนาการของอาการใบขาวในดินที่ได้จากหน้าดินจาก 2 แหล่ง ได้แก่ ชุดดินวาริน จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน จากแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี โดยแบ่งข้อเลขคี่จากโคนของทุกลำปลูกในดิน ศวร.ขก. และข้อเลขคู่ปลูกในดิน ศวร. สุพรรณบุรี และให้น้ำ พบว่าข้อจากลำที่มีอาการยอดขาวแม้งอกเป็นใบเขียวในระยะแรก แต่จะพัฒนาต่อเป็นใบขาวในที่สุด และมักพบว่าข้อที่อยู่ตอนโคนแสดงอาการใบขาวเร็วกว่าส่วนที่อยู่เหนือขึ้นไป และพบว่าอาการใบขาวที่ปลูกในดินจาก ศวร. สุพรรณบุรี มีระยะเวลาการคงตัวนานกว่าใบขาวที่อยู่ในดินจาก ศวร. ขก. (Fig.3) แต่ที่ระยะเวลา 142 วันนับจากวันปลูก ต้นที่มีอาการใบขาวตายหมดทุกต้น โดยระยะเวลาที่ 109 วัน ต้นใบขาวที่ปลูกในดิน ศวร.ขก. มีจำนวนต้นตายมากกว่าที่ปลูกในดิน ศวร. สุพรรณบุรี (Fig.4) สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากคุณลักษณะของดิน ที่ต้องทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

					หมายเลขลำ				
ข้อที่	2	9	14	15	11	3	5	13	16
1	G/W/W/-	GW/W/W/-	G				G	G/GW/GW/-	
2	G/G/GW/GW/-		G		G	G/GW/GW/GW/-	G	G/GW/GW/-	G
3	G/GW/GW/-		G	G	G	G/GW/GW/-	G	G/GW/GW/-	G
4	G/G/GW/GW/-	G/W/W/-	G		G	G/GW/GW/-	G	G/-	G
5	G/GW/-	GW/W/W/-	G		G				G
6	G/GW/GW/GW/-	G/W/W/-	G	G	G	G/GW/-	G	G/GW/GW/-	G
7	GW/GW/W/-	GW/W/W/-	G		G	G/G/G/-	G	G/W/W/-	G
8	G/GW/GW/GW/-	G/W/W/-	G		G	G/G/GW/GW/-		G/GW/GW/-	G
9	G/G/GW/W/-	GW/GW/GW/-	G	G		G/GW/-	G	G/W/W/-	G
10	G/GW/GW/-	G/G/GW/-	G	G	G	G/G/GW/GW/-	G	G/GW/GW/-	

Figure 3. White leal symptom expression in sugarcane seedlings in top leaf at day 1, 27, 63, 109 and 142 days after planting. G: green, GW: green/white; W: white. - : died. Odd : planting in warin soil surface series; even number planting in Kampaensaen soil series.

ผลการตรวจปริมาณเชื้อช่วงวันที่ 67 หลังการย้ายปลูกพบว่ากลุ่มต้นที่แสดงอาการใบขาวมีเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณสูง สามารถตรวจพบเชื้อได้ทั้งในตำแหน่ง 700 bp, 210 bpและ secA ในระดับตั้งแต่ 1+ ถึง 4+ ส่วนกลุ่มที่ไม่มีอาการใบขาว ตรวจพบได้ทั้ง 210 bpในระดับ 4+ และ secA ในระดับตั้งแต่ 1+ ถึง 4+ ผลการตรวจปริมาณเชื้อในแต่ละต้น พบว่าต้นที่ปลูกในดิน ศวร.ขก. มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในดินลานโพธิ์ แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดอาจมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นได้

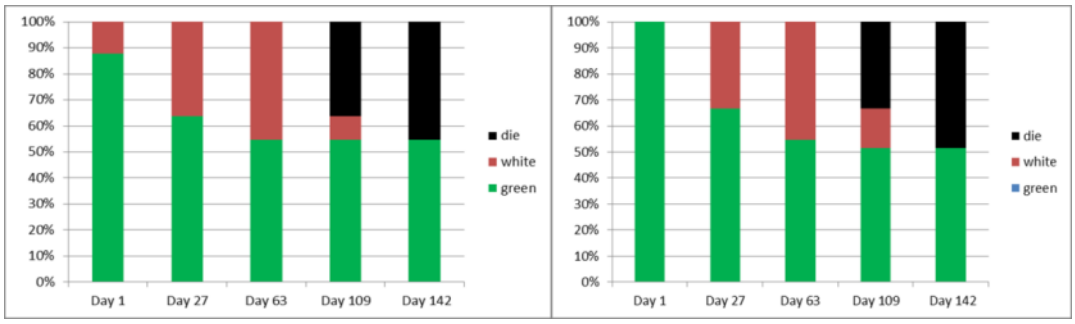

Figure 4. White leaf symptom expression in sugarcane seedlings derived from white leaf infected seed canes planting in warin soil surface series (left) and in Kampaensaen soil series (right) at day 1-142 days after planting.

การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อยที่ปลูกในหน้าดินจากทั้งสองแหล่ง พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีปริมาณในระดับต่ำ คือ <0.5 – 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัมซึ่งไม่แสดงอาการใบขาว แต่พบว่ากลุ่มตัวอย่างที่ปลูกอยู่ในชุดดินวารินจะมีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ปลูกในชุดดินกำแพงแสน เช่นเดียวกับผลการทดลองข้างต้น

ความแตกต่างของปริมาณเชื้อโรคใบขาวในแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน

การเพาะอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่ปลูกในแหล่งดินชนิดอื่น เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ โดยการปลูกเปรียบเทียบในชุดดินเดิมและชุดดินวาริน แหล่งปลูกที่นำต้นกล้ามาปลูกเปรียบเทียบ ได้แก่ อ. โนนสูง จ. นครราชสีมา และ จ. บุรีรัมย์ ที่มีเชื้ออยู่ระดับสีฟ้า-เขียว-เหลือง เก็บตัวอย่างอ้อยจากแหล่งปลูกต่างๆ 6 แหล่งๆ ละ 20 ลำ ได้แก่ ลำปลายมาศ โนนสูง บุรีรัมย์ ศรีษะเกษ สุรินทร์ และสุพรรณบุรีทำการเพาะกล้าในถุงและรอการเจริญเติบโต เพื่อแบ่งนำกลับปลูกแหล่งเดิม และท่าพระ เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ ผลการตรวจเชื้อใบขาวในตัวอย่างใบที่เก็บจาก ศวพ. ต่างๆ 5 แหล่ง ได้แก่ ศรีษะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ (ลำปลายมาศ) นครราขสีมา (โนนสูง) และบุรีรัมย์ พบว่า อ้อยจาก ศวพ.สุรินทร์มีปัญหา อ่อนแอ และไม่งอก ส่วนที่เหลือทั้งหมดมีเชื้อใบขาวอยู่ในระดับ 0.5-10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ซึ่งพบว่าไม่แสดงอาการใบขาว เนื่องจากปริมาณเชื้อระดับนี้พบว่าไม่สามารถกระตุ้นให้แสดงอาการใบขาวได้จากสภาพแวดล้อม แต่อาจจะแสดงอาการได้ในระดับอ้อยตอ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวทำการศึกษาใน 2 วิธีการ คือ (1) การชักนำอาการใบขาวด้วยภาวะร้อนและแล้ง เพื่อศึกษาระดับปริมาณเชื้อที่สามารถชักนำอาการใบขาวได้ และ (2) การชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของหน้าดิน

การทดสอบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณสูง ตั้งแต่ 100 copy/µl ในดีเอ็นเออ้อย 25 ng หลังการทดสอบด้วยสภาวะแล้ง และฟื้นสภาพต้นด้วยการให้น้ำ เป็นเวลา 3 วัน สามารถตรวจพบการเปลี่ยนสีของใบจากเขียวเป็นขาว แสดงให้เห็นว่าสภาวะแล้งสามารถชักนำอาการใบขาวในอ้อยที่มีเชื้อไฟโต

พลาสมาระดับนี้ได้ การทดสอบในต้นที่มีเชื้ออยู่ในน้อยกว่า 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม และระดับปริมาณเชื้อที่ 10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัมหรือน้อยกว่า (รหัสสีส้มระดับ 1) พบว่าไม่สามารถชักนำอาการใบขาว พบว่าไม่แสดงอาการใบขาวหลังต้นฟื้น การทดสอบในต้นที่มีเชื้อ <0.5 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ถึง <10 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng พบว่าหน่อใหม่ที่งอกมีสีเขียวและมีเชื้อในระดับสีฟ้า (<0.5 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ถึงสีเขียวระดับ 3 (<1 copy/µl ใน DNA พืช 25 ng) ผลการตรวจปริมาณเชื้อในหน่อใหม่พบว่ากลุ่มที่มีสีฟ้าและสีเขียวในระดับ 1-2 จะมีปริมาณเชื้อในหน่อใหม่ในระดับสีฟ้า ส่วนในต้นที่มีเชื้อในระดับสีเขียวระดับ 3 หน่อใหม่ที่ได้จะมีในระดับสีฟ้าและสีเหลืองระดับ 1 (1 copyµใน DNA พืช 25 ng) แสดงให้เห็นว่าหน่อใหม่ของกลุ่มที่มีเชื้อสีเขียวระดับ 3 อาจมีการเพิ่มปริมาณเชื้อในรุ่นหน่อ ซึ่งจากการทดลองเพิ่มพบว่าในสีเหลืองระดับ 1 นี้ จะให้หน่อเป็นต้นใบขาว

การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีในกลุ่มที่ติดเชื้อใบขาวระดับสูง พบว่า กิจกรรมเอ็นไซม์ APX, ปริมาณสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโปรตีนรวม พบว่ามีค่าแตกต่างกันขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างและช่วงอายุ แต่ยังขาดข้อมูลแป้งและน้ำตาลรวม ซึ่งต้องใช้ประกอบการวิเคราะห์ และต้องทำการตรวจเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่มีอาการใบขาว

การทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของหน้าดินที่ได้จากชุดดินวารินและกำแพงแสนโดยใช้ต้นที่มีปริมาณใบขาวสูง พบว่าต้นที่มาจากลำใบขาวพัฒนาเป็นใบขาวได้ แต่ต้นใบขาวที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน มีการตายช้ากว่า ผลการตรวจปริมาณเชื้อช่วงวันที่ 67 หลังการย้ายปลูกพบว่าต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินวาริน. มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดอาจมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นได้

ในการทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของดิน ได้ทำการเพาะอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่ปลูกในแหล่งดินชนิดอื่น เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ โดยการปลูกเปรียบเทียบในชุดดินเดิมและชุดดินวาริน ทำการปลูก 5 แหล่ง ได้แก่ ศวพ. บุรีรัมย์ แปลงเกษตรกรที่ลำปลายมาศ ศวพ.สุรินทร์ ศวพ.โนนสูง และ ศวพ. ศรีษะเกษ ผลการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวจากใบของลำที่นำมาจากแหล่งต่างๆ นั้นพบว่ามีเชื้อใบขาวตั้งแต่ 0.5-10 copy/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม พบว่าไม่แสดงอาการใบขาวในอ้อยปลูก

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

9.1 เผยแพร่ผลการทดลองโดยการตีพิมพ์ผลงานในวารสารทางวิชาการ การนำเสนองานภาคบรรยายหรือโปสเตอร์ในการประชุมทางวิชาการ

10. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเกษตรกร นายสนอง โพธิ์ตาทอง และครอบครัว นักวิชาการเกษตรของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นหลายท่าน นางสาวรวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์ และนักวิชาการผู้ช่วย นางสาวปิยะรัตน์ จังพล ที่สนับสนุนท่อนพันธุ์อ้อยสำหรับการทดลองนี้ ทำให้สามารถดำเนินการทดลองได้ด้วยดี

11. เอกสารอ้างอิง

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ รังสี เจริญสถาพรประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ และ กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2558ก. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 69-89.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ สุนี ศรีสิงห์. **2558ข.** การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบางชนิดในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว. *ใน :รายงานเรื่องเต็มประจำปี 2558. สถาบันวิจัยพืชไร่* กรมวิชาการเกษตร

Martini, M., P. Ermacora, G.Magris, F.Ferrini, N.Loi. 2011. Symptom expression and Candidatus Phytoplasma prunorum' concentration in different Prunus species. Bulletin of Insectology 64 (Supplement): S171-S172.

Musetti R., L. Sanità Di Toppi, M. Martini, F. Ferrini, A. Loschi, M.A. Favali and R. Osler, 2005. Hydrogen peroxide localization and anti- oxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. European Journal of Plant Pathology 112, 53–61.

Roggiaab, C., P. Caciaglia, L. Galettoa, D. Pacificoa, F. Verattia, D. Boscob andC. Marzach. 2014. Flavescencedoreephytoplasmatitre in field-infectedBarbera and Nebbiolo grapevines. Plant Pathology.63, 31–41.

Sakuanrungsirikul, S., T. Wongwarat, S. Sankot, K. Kawabe, Y. Kobori and S. Ando. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and their detection methods. Proc. Int. Soc. Sugar cane technol., Vol 28, 2013.

12. ภาคผนวก

Table 1. Leaf color in sugarcane var. KK3 seedlings derived from white leaf infected seedcanes at post-treatment in the control environment chamber conditioned with 33 °C temperature, 55% RH, 20,000 LUX light density, 14/10 hrs light/dark periods, no water. G : green, WG : white and green, W : white

Stalk no.	Bud no.	Leaf no.	Pre-treatment symptom	Post-treatment leaf symptom at 3 days recovery	Post-treatment leaf symptom at 90 days recovery
KK3_T10	1	1	WG	Brown, wilting, dry	died
		2	WG	WG, dry tip	died
		3	WG	WG, dry tip	died
		4	W	WG, dry tip	died
		5	W	W, dry tip	died
	2	1	WG	Brown, wilting, dry	died
		2	WG	Brown, wilting, dry	died
		3	WG	W, dry tip	died
		4	WG	W, dry tip	died
		5	W	W, dry tip	died
	3	1	WG	Brown, wilting, dry	died
		2	WG	Brown, wilting, dry	died
		3	WG	WG, dry tip	died
		4	WG	W, dry tip	died
		5	W	W, dry tip	died
	4	1	WG	Brown, wilting, dry	died
		2	WG	Brown, wilting, dry	died
		3	WG	W, dry tip	died
		4	W	W, dry tip	died
KK3_T11	1	1	G , dry tip	Brown, wilting, dry	died
		2	G	G dry tip	died
		3	G	Brown, wilting, dry	died
		4	G	G dry tip	died
		5	G	WG, dry tip	died
	2	1	G	Brown, wilting, dry	died
		2	G	Brown, wilting, dry	died
		3	G	G dry tip	died
		4	G	G dry tip	died
		5	G	WG, dry tip	died
	3	1	Brown, wilting,	Brown, wilting, dry	died
		2	G	Brown, wilting, dry	Died
		3	G	G dry tip	died
		4	G	G dry tip	died

Table 1. Cont.

Stalk no.	Bud no.	Leaf no.	Pre-treatment symptom	Post-treatment leaf symptom at 3 days recovery	Post-treatment leaf symptom at 90 days recovery
		5	G	G dry tip	died
KK3_T12	1	1	Brown, wilting,	Brown, wilting, dry	died
		2	G	Brown, wilting, dry	died
		3	G	Brown, wilting, dry	died
		4	G	WG (40% recover) brown tip	died
		5	G	WG (60% recover) brown tip	died
		6	-	WG (100% recover)	died
	2	1	G brown tip,	Brown, wilting, dry	died
		2	G	Brown, wilting, dry	died
		3	G brown tip	Brown, wilting, dry	died
		4	G brown tip	WG (40% recover)brown tip	died
		5	G brown tip	WG (50% recover)brown tip	died
		6	-	New shoot (100% recover)	died
	3	1	G brown tip	Brown, wilting, dry	died
		2	G brown tip	WG (20% recover)brown tip	died
		3	G brown tip	WG (40% recover) brown tip	died
		4	G brown tip	WG (60% recover) brown tip	died
	4	1	G brown tip		died
		2	G brown tip	New shoot (WG	died
		3	G brown tip		died
KK3_T12	5	1	G brown tip	G	died
		2	G	WG (40% recover)brown tip	died
		3	WG	W (10% recover)brown tip	died
		4	WG	W (50% recover)brown tip	died
		5	-	W new shoot	died
KK3_T8	6	1	G	Brown, wilting, dry	died
		2	G	WG (50% recover)brown tip	died
		3	G	WG (20% recover)brown tip	died
		4	G	WG (60% recover)brown tip	died
		5	G	WG brown tip	died
	7	1	G	Brown, wilting, dry	2 shoots
		2	G	G yellow (50% recover)brown tip	1 st shoot 5 leaves: G-G-G-GW-
		3	G	G yellow (60% recover)brown tip	2ก shoot 4 leaves : G-G-G-WG
		4	G	G yellow (10% recover)brown tip	
	8	1	G	Brown, wilting, dry	died
		2	G	WG (10% recovery)	died
		3	G	WG (40% recover)brown tip	died
		4	G	WG (70% recover)brown tip	died
		5	G	WG (80% recover)brown tip	died
	9	1	G	New shoot G	New shoot 3 leaves : G-G-G
		2	G brown tip		
		3	G		

Table 2. White leaf disease phytoplasma concentration based on 16S-23S rDNA nested-PCR and secA gene detection methods in Leaf of sugarcane var. KK3 and LK92-11 seedlings derived from white leaf infected seed canes at pre-treatment in the control environment chamber.

4+ : highest phytoplasma concentration (1000-10000 cells/ul in 25 ng plant DNA). WL1-1 to WL18-5 : KK3 WL19-1 to WL20-4 : LK92-11

No.	700 bp	210 bp	Sec A	Disease color	Phytoplasma conc. copy/µl in 25 ng plant	Pretreat Leaf color	Post treat leaf color
WL1-1	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL1-2	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL1-3	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G*
WL1-4	-	4+	+/-		<10	YG	G
WL1-5	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL2-1	-	4+	+/-		<10	YG	G
WL2-2	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL2-3	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL2-4	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL2-5	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL3-1	-	0.5+	+/-		>0.5	YG	G
WL3-2	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL3-3	-	2+	+/-		>0.5	YG	G
WL3-4	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL3-5	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G /died
WL4-1	-	1+	+/-		>0.5	YG	G /died
WL4-2	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G /died
WL4-3	-	4+	+/-		<10	YG	G /died
WL4-4	-	4+	+/-		<10	YG	G /died
WL4-5	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G /died
WL5-1	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G /died
WL5-2	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G /died
WL5-3	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G /died
WL5-4	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL5-5	-	+/-	0.5+		10	YG	G /died
WL6-1	-	+/-	0.5+		10	YG	G /died
WL6-2	-	+/-	0.5+		10	YG	G /died
WL6-3	-	+/-	0.5+		10	YG	G /died
WL6-4	-	+/-	0.5+		10	YG	G
WL6-5	-	+/-	+/-		<0.5	YG	G
WL7-1	-	+/-	+/-		<0.5	G	G /died
WL7-2	-	+/-	<0.5+		<0.5	G	G /died
WL7-3	-	+/-	<0.5+		<0.5	G	G /died
WL7-5	-	+/-	<0.5+		<0.5	G	G /died
WL8-1	-	+/-	+/-		<0.5	G	G /died
WL8-3	-	+/-	+/-		<0.5	G	G /died
WL8-4	-	+/-	<0.5+		<0.5	G	G /died
WL8-5	-	+/-	<0.5+		<0.5	G	G /died
WL9-1	-	+/-	+/-		<0.5	G	G /died

Table 2 Cont.

No.	700 bp	210 bp	Sec A	Disease color	Phytoplasma conc. copy/µl in 25 ng plant	Pretreat Leaf color	Post treat leaf color
WL9-2	-	+/-	+/-		<0.5	G	G /died
WL9-3	-	+/-	+/-		<0.5	G	G /died
WL9-5	-	+/-	+/-		<0.5	G	G
WL10-1	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL10-2	-	4+	+/-		<10	dry	G /died
WL10-3	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL10-5	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL11-1	-	4+	+/-		<10	dry	G /died
WL11-3	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL11-4	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL11-5	-	2+	+/-		>0.5	dry	G /died
WL12-1	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL12-2	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL12-3	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL12-4	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL13-1	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL13-2	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL13-3	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL13-4	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL14-2	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL14-3	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL14-4	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL14-5	-	4+	+/-		<10	dry	G /died
WL15-2	-	2+	+/-		>0.5	dry	G /died
WL15-3	-	+/-	+/-		<0.5	dry	G /died
WL15-4	-	4+	+/-		<10	dry	G /died
WL15-5	-	4+	+/-		<10	dry	G /died
WL16-1	-	4+	+/-		<10	-	-
WL16-2	-	4+	+/-		<10	-	-
WL16-4	-	3+	+/-		1	-	-
WL17-1	-	+/-	+/-		<0.5	-	-
WL17-2	-	4+	+/-		<10	-	-
WL17-3	-	0.5+	+/-		>0.5	-	-
WL17-4	-	+/-	+/-		<0.5	-	-
WL17-5	-	+/-	+/-		<0.5	-	-
WL18-2	-	4+	+/-		<10	-	-
WL18-3	-	4+	+/-		<10	-	-
WL18-4	-	4+	+/-		<10	-	-
WL18-5	-	4+	+/-		<10	-	-
WL19-1	-	4+	+/-		<10	-	-
WL19-2	-	4+	+/-		<10	-	-
WL19-3	0.5+	4+	+/-		10	-	-
WL19-4	-	4+	+/-		<10	-	-
WL20-1	-	4+	+/-		<10	-	-
WL20-2	<0.5+	4+	1+		100	-	-
WL20-3	<0.5+	4+	2+		1,000	-	-
WL20-4	1+	4+	4+		100,000	-	-