การสำรวจโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* และ *Sugarcane streak mosaic virus* และการใช้น้ำร้อนในการกำจัดโรคในท่อนพันธุ์อ้อย

Survey of *Sugarcane Mosaic Virus* and *Sugarcane streak mosaic virus* Control Disease by Hot Water Treatment in Sugarcane

วีรกรณ์ แสงไสย์[1/] เบญจวรรณ รัตวัตร[1/] ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1/]
รวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์[2/] นัฐภัทร์ คำหล้า[3/]
Weerakorn Seangsai[1/] Benjawan Ruttawat[1/] Suchirat Sakuanrungsirikul[1/]
Raweewan Chuekittisak[2/] Nattapat Khumla[3/]

ABSTRACT

Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV), which is in the same family as *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) is a member of the family Potyviridae. The main symptoms of SCSMV are a mottled streaky pattern of light and dark green on the leaves, similar in appearance to (SCMV); symptom variation with different varieties is common SCSMV will be infected cane and transmitted by aphids. The objective of this study was to survey and detect of streak mosaic symptom in sugarcane. Disease surveying was done in 7 sugarcane planting areas such as Kamphaeng Phet, Nakhon Sawan, Chaiyaphum, Buriram, Nakhon Ratchasima, Suphanburi and Kanchanaburi totally 158 samples were collected. Disease detection using the RT-PCR technique amplified fragments of 572 bp. almost all these positive samples were detected. The most detected in LK92-11 and Khon Kaen 3 respectively, at 60 to 94 % were infected. DNA sequence matching 98 % with Sugarcane streak mosaic virus isolate FKB1 polyprotein gene, partial cds (KP987848.1) in NCBI. The results of hot water treatment to eliminate the virus found that the process by hot water at 50 °C for 5 hours or at 52 °C for 30 minutes, leaving for 24 hours, then soaking in hot water at 50 °C for 2 hours was able to effectively eliminate the virus in seed cane effectively.

Keyword: Sugarcane, SCSMV, SCMV, Virus, Hot water treatment

[1/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000
[1/] Khon Kaen Field Crops Research Center, Sila, Mueang Khon Kaen, Khon Kaen, 40000
[2/] ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี ตำบลท่าช้าง อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี 34190
[2/] Ubonratchathani Field Crops Research Center, Tah Chang, Sawangwirawong, Ubonratchathani, 34190
[3/] ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ตำบลสุขสำราญ อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ 60190
[3/] Nakhon Sawan Field Crops Research Center, Suksamran, Tak Fa, Nakhon Sawan, 60190

บทคัดย่อ

โรคใบด่าง Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) และ Sugarcane mosaic virus (SCMV) จัดอยู่ใน family Potyviridae ลักษณะของโรคใบอ้อยมีอาการด่างเป็นรอยขีดสั้น ๆ สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ เมื่อส่องใบกับแสงแดด จะเห็นรอยด่างชัดเจน อาการที่ปรากฏบนใบอ่อนเห็นได้ชัดเจนกว่าใบแก่ ในพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคอาจปรากฏรอยขีดด่างบนลำอ้อยด้วยสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์และถ่ายทอดเชื้อโดยเพลี้ยอ่อนได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจแปลงอ้อยที่มีอาการใบด่างและตรวจยืนยันชนิดเชื้อที่เข้าทำลาย โดยสำรวจในพื้นที่ปลูกอ้อย 7 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดกำแพงเพชร นครสวรรค์ ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี ผลการดำเนินงานรวบรวมตัวอย่างอ้อยได้ 158 ตัวอย่าง ทำการตรวจเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้ขนาดดีเอ็นเอ 572 bp ผลการตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างอ้อยแปลงเกษตรกรในแต่ละพื้นที่ พบการติดเชื้อไวรัส SCSMV ในทุกแปลงอ้อยที่สำรวจ พบเชื้อมากที่สุดในระยะอ้อยตอ LK92-11 รองลงมาคือพันธุ์ขอนแก่น 3 โดยพบการติดเชื้อไวรัสร้อยละ 60 ถึง 94 ตามลำดับ เมื่อนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียกับฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความคล้ายคลึงเชื้อไวรัส SCSMV (KP987848.1) ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการตรวจเชื้อไวรัส SCMV ไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างอ้อย ผลการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยการแช่น้ำร้อน พบว่า กรรมวิธีที่แช่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง หรือแช่ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อไวรัสสาเหตุใบด่างในท่อนพันธุ์อ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: อ้อย ใบด่าง SCSMV SCMV ไวรัส แช่น้ำร้อน

บทนำ

โรคใบด่างในอ้อยเกิดจากเชื้อไวรัสสองชนิด ได้แก่ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) และ *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) โดยเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Gemechu *et al*., 2006) จัดจำแนกอยู่ใน family Potyviridae เป็นเชื้อไวรัสมีอนุภาคเป็นท่อนยาวคดขนาดประมาณ 750 นาโนเมตร อนุภาคไวรัสเกาะตัวกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่กับตะกอนที่อาจจะเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์พืชและจะพบผลึกโปรตีน (inclusions bodies) แบบ laminate aggregate อยู่ในไซโตพลาสซึมของพืชที่เป็นโรค (พิสสวรรณ และคณะ,2550) สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีกลและเพลี้ยอ่อน เมื่ออ้อยได้รับเชื้อจะมีปริมาณคลอโรฟิลล์ในใบลดลงทำให้ใบอ้อยด่าง สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ จะเห็นรอยด่างบนใบอ่อนชัดเจนกว่าที่ใบแก่ในพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคอาจปรากฏรอยขีดด่างบนลำอ้อยด้วย การเจริญเติบโตลดลง ลำอ้อยเล็กลีบลง (Zambrano *et al.,* 2003) ทำให้ผลผลิตลดลงได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ โดยมีพืชอาศัย ได้แก่ ข้าวโพด หญ้าหลายชนิด และอ้อย โรคใบขีดด่างเกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) มีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาด 890 x 15 นาโนเมตร มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวแบบ positive sense ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส จัดจำแนกอยู่ในจีนัส *Poacevirus* โรคนี้มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบด่างที่เกิดจากไวรัส SCMV โดยเฉพาะที่ใบยอด ใบอ้อยด่างเป็นรอยขีดสั้น ๆ สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ เมื่อส่องใบกับแสงแดด จะเห็นรอยด่างชัดเจน อาการที่ปรากฏบนใบอ่อนเห็นชัดเจนกว่าใบแก่ ในพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคอาจปรากฏรอยขีดด่างบนลำอ้อยด้วย (Kasemsin *et al.,* 2011) โดยมีรายงานครั้งแรกในประเทศปากีสถาน เมื่อปี ค.ศ. 1998 และได้มีการสำรวจในอินโดนีเซีย ระหว่างปี ค.ศ.

2008 - 2009 พบการระบาดมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ พบในพันธุ์ PS 864 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอที่สุด มีความเสียหายต่อผลผลิตมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตน้ำตาลสูญเสียไปถึง 20 เปอร์เซ็นต์ โรคนี้สามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ และมีดตัดอ้อย สามารถถ่ายทอดผ่านเพลี้ยอ่อนได้ มีพืชอาศัยได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และหญ้า *Dactyloctenium aegyptium* (Putra *et al.,* 2014) ปัจจุบันมีรายงานความเสียหายของการระบาดของโรคขีดใบด่างนี้ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ในอ้อยพันธุ์ cv. R575 ที่ประเทศโกตดิวัวร์ (Daugrois *et al.,* 2020) และมีรายงานการระบาดในประเทศผู้ปลูกอ้อยในทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย ไทย บังกลาเทศ ศรีลังกา และเวียดนาม (Putra *et al.,* 2013) ปัจจุบันเชื้อไวรัสนี้ได้แพร่กระจายเป็นวงกว้างและเพิ่มความเสียหายให้อ้อยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง มักพบได้มากในแหล่งปลูกอ้อยของประเทศไทย แต่ยังไม่มีรายงานความเสียหายจากโรคนี้ ทำให้เกิดการละเลยและอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น วิธีการป้องกันกำจัดโรคใบขีดด่างที่ดีที่สุด คือ การใช้พันธุ์สะอาดปราศจากโรค การขยายพันธุ์อ้อยสะอาดทำได้โดยการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยน้ำร้อนสามารถป้องกันกำจัดโรคในท่อนพันธุ์ได้ สุนี และคณะ (2557) ได้ทดสอบการแช่น้ำร้อนในท่อนพันธุ์อ้อยสามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวได้ แต่การใช้เวลานานในการแช่ท่อนพันธุ์ทำให้ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยลดลง การแช่ท่อนพันธุ์อ้อยสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เมื่ออ้อยอายุ 1-2 เดือน และเมื่อนำต้นกล้าที่ไม่แสดงอาการไปปลูกอ้อยปลูกจะไม่แสดงอาการใบขาวจนถึง 10 เดือน เมื่อนำอ้อยที่ผ่านกรรมวิธีการแช่น้ำร้อนแล้วอายุ 7 เดือน ไปตรวจสอบการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว พบว่าการแช่น้ำร้อน 2 ครั้งหรือ Dual hot water treatment (DHWT) ไม่แตกต่างจากการแช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงเพียง 1 ครั้ง ในท่อนพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการของโรคจากแปลงที่เป็นโรคใบขาว เมื่อนำมาผ่านกรรมวิธีแช่น้ำร้อนสามารถลดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ Damayanti and Putra (2011) ได้ทดสอบการใช้น้ำร้อนแช่ท่อนพันธุ์อ้อยเพื่อกำจัดเชื้อไวรัส SCSMV โดยทดสอบแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่ติดเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, 55 องศาเซลเซียส, 60 องศาเซลเซียส และ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำน้ำคั้นอ้อยมาตรวจติดตามเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบว่า ท่อนพันธุ์อ้อยที่แช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 55 องศาเซลเซียส สามารถตรวจเจอเชื้อไวรัส ส่วนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ 65 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบเชื้อในท่อนพันธุ์ ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจการเกิดโรคใบด่างในแปลงอ้อยจากแหล่งปลูกอ้อยที่สำคัญของประเทศไทย และทดสอบการแช่ในน้ำร้อนท่อนพันธุ์อ้อยเพื่อการกำจัดเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์อ้อยเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการท่อนพันธุ์ให้สะอาดลดการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างอ้อยที่มีอาการใบด่าง

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างอ้อยในปี 2563 บริเวณจังหวัดกำแพงเพชร นครสวรรค์ ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี ใช้หลักการเก็บแบบ grid pattern ดัดแปลงวิธีการจากสิทธิศักดิ์และคณะ (2554) เก็บเฉพาะตัวอย่างที่แสดงอาการที่สงสัยว่าเป็นโรค โดยเดินสำรวจในแปลงหากอที่เป็นโรค โดยจำแนกตามลักษณะ อาการใบด่าง สังเกตอาการด่างเป็นรอยขีดสั้นๆ สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ ใบเป็นฝอย มีสีเขียวซีดแล้วเปลี่ยนเป็นเขียวอมเหลือง สีเหลือง สีขาวปนเหลือง และสีขาวซีด พร้อมระบุพิกัด โดยเก็บตัวอย่างใบอ้อยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การตรวจเชื้อไวรัสใบด่าง

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ้อยโดยบดใบพืชแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม ด้วยโกร่งจนได้เป็นผงละเอียดสีเขียวถ่ายผงใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ RLT 450 µl ลงในหลอด ผสมอย่างแรงให้เข้ากันทันที ดูดสารผสมที่ได้ใส่ลงในคอลัม QIA shredder spin ปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาทีดูดของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอดใหม่ เติม 96% เอธานอลปริมาตรครึ่งเท่าผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารผสมที่ใส่ในคอลัมน์ RNeasy Mini spin ปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วินาที เติมบัฟเฟอร์ RW1 700 µl ลงในคอลัมน์ปั่นด้วย ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที ทิ้งของเหลว จากนั้นนำคอลัมน์ที่ได้ไปเติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ปั่นด้วย ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที ทิ้งของเหลว เติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์นำไปปั่นด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวม โดยตรวจวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel ใน 1X NBC buffer (1M Boric acid, 20mM Sodium acetate และ 100mM NaOH (pH7.5)) และเติม 37% formaldehyde โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

2.1 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

การสร้าง cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาในหลอดที่มีอาร์เอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ Oligo dT12-18 (Invitrogen, USA) RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA) และ Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA) หลังจากบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะได้ cDNA ที่พร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction (RT-PCR) ปฏิกิริยา RT-PCR: มีส่วนประกอบดังนี้ cDNA (เจือจาง 1:50) ปริมาตร 3 µl 10X Taq reaction buffer ปริมาตร 1.5 µl 10 µM forward primer ปริมาตร 0.4 µl 10µM reverse primer ปริมาตร 0.4 µl (SCSMV-CPF 5’ACA GCAGAWGCAACRGCACAAGC’3/SCSMV-CPR 5’TTCGGCAATCTCACTGGTCTG’3) 2.5 mM dNTP ปริมาตร 1.2 µl 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl Taq DNA polymerase (5 U /µl) (Fermentas) ปริมาตร 0.3 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7.1 µl นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ตั้งโปรแกรมจำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ย้อมดูผลด้วยสี SYBR Gold และบันทึกผลภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์ภาพดีเอ็นเอ (Gel Documentation) การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดำเนินการโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา RT-PCR ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น สกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยกัดชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป GF-1 AmpbiClean Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI จัดเรียงและสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Molecular Evolutionary Genetics Analysis; MEGA ver. 5.0 software ในรูปแบบ neighbor-joining method

2.2 การโคลนยีน

เตรียมตัวอย่าง DNA ยีนเป้าหมายบริเวณ 16S-rDNA มาทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ คู่ Primer SCSMV-CPF/ SCSMV-CPR และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ โดยวิธี electrophoresis สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เทคนิค gel elution ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Promega, USA) นำชิ้นยีนที่ทำบริสุทธิ์มาเชื่อมกับ เวคเตอร์ pGEM-T และเคลื่อนย้ายพลาสมิดที่มียีน SCSMV-CP เข้าสู่ component cells เชื้อ E.coli สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี Heat shock transformation ทำการ คัดเลือกเชื้อที่มียีนในอาหารแข็ง LB ที่มี X-gal และ 50 mg/L แอมพิซิลลิน โดยวิธี spread plate เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวมา steak ในอาหารแข็ง LB ที่มี 50 mg/L แอมพิซิลลิน และ เขี่ยเชื้อส่วนที่เหลือมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ได้ รับยีนเข้าไปตรวจสอบยีนโดยวิธี PCR ที่ใช้ คู่ primer SCSMV-CPF/ SCSMV-CPR แล้วนำผลผลิต PCR ตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis นำเชื้อไปเลี้ยงเพิ่มจำนวน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอล 50 % สำหรับใช้เป็นตัวอย่าง ควบคุมต่อไป

2.3 การทดสอบหาปริมาณยีน SCSMV-CP ด้วย qRT-PCR

เตรียมดีเอ็นเอ 16S-rDNA ยีน SCSMV-CP ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (deionized water) ในระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^1 - 10^{10} โดยใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่าง 20 ng/µl ปริมาณ 3 µl ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR มีส่วนประกอบดังนี้ cDNA ปริมาตร 3 µl 10X Taq reaction buffer ปริมาตร 1.5 µl 10 µM forward primer ปริมาตร 0.25 µl 10µM reverse primer ปริมาตร 0.25 µl (SCSMV-CPF 5'ACA GCAGAWGCAACRGCACAAGC'3 /SCSMV-CPR 5'TTCGGCAATCT CACTGGTCTG'3) 2.5 mM dNTP ปริมาตร 1.2 µl 25mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl Syto-9 ปริมาตร 0.5 µl Taq DNA polymerase (5 Unit/µl) (Fermentas) ปริมาตร 0.3 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 7.1 µl นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal cycle ตั้งโปรแกรมจำนวน 45 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 45 วินาที 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 3 ซ้ำ ตามกรรมวิธีการทดสอบ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR หาค่าระดับต่ำที่สุดของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้และนำเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนระดับต่ำที่สุดนั้นมาหาจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจได้

3. การใช้น้ำร้อนในการกำจัดเชื้อโรคใบด่างในท่อนพันธุ์อ้อย

นำตัวอย่างอ้อยที่มีอาการใบด่าง ตรวจยืนยันและตรวจปริมาณเชื้อไวรัสตั้งต้นของเชื้อสาเหตุด้วยวิธี RT-PCR ที่มีระดับปริมาณเชื้อเท่ากัน จากนั้นนำลำอ้อยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างข้างต้นตัดท่อนพันธุ์ขนาด 1 ตาและนำท่อนพันธุ์ไปแช่ในน้ำร้อนตามกรรมวิธี โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 10 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

1) ท่อนอ้อยติดเชื้อ แช่ที่ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (DHWT)
2) ท่อนอ้อยติดเชื้อ แช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
3) ท่อนอ้อยติดเชื้อ แช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
4) ท่อนอ้อยติดเชื้อ แช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
5) ท่อนอ้อยติดเชื้อ แช่ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

6) ท่อนอ้อยสะอาด แช่ที่ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (DHWT)
7) ท่อนอ้อยสะอาด แช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
8) ท่อนอ้อยสะอาด แช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง
9) ท่อนอ้อยสะอาด แช่ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง
10) ท่อนอ้อยสะอาด แช่ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

เพาะชำท่อนพันธุ์ดังกล่าวในกระถาง อ้อยอายุประมาณ 3 เดือน ตรวจเช็คความงอก อาการใบด่าง ตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธี real-time PCR

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจและรวบเก็บตัวอย่าง

การสำรวจในปี 2563 อ้อยที่มีลักษณะโรคใบด่างสังเกตจากอาการด่างเป็นรอยขีดสั้น ๆ สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ ใบเป็นฝอย มีสีเขียวซีดแล้วเปลี่ยนเป็นเขียวอมเหลือง สีเหลือง สีขาวปนเหลือง และสีขาวซีด (Figure 1) สามารถรวบรวมตัวอย่างได้ทั้งสิ้น 158 ตัวอย่าง มีพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 และ LK92-11 เป็นตัวอย่างจากแหล่งปลูกอ้อยในเขตจังหวัดกำแพงเพชร จำนวน 22 ตัวอย่าง นครสวรรค์ จำนวน 24 ตัวอย่าง ชัยภูมิ จำนวน 22 ตัวอย่าง นครราชสีมา จำนวน 23 ตัวอย่าง บุรีรัมย์ จำนวน 22 ตัวอย่าง สุพรรณบุรี จำนวน 22 ตัวอย่าง และกาญจนบุรี จำนวน 23 ตัวอย่าง (Table 1)

การตรวจเชื้อไวรัส

ตรวจเชื้อไวรัสจากตัวอย่างอ้อยแปลงเกษตรกรในแต่ละพื้นที่ จำนวน 158 ตัวอย่าง พบว่าตรวจพบเชื้อไวรัส *Sugarcane streak mosaic virus* ได้ที่ขนาด 572 คู่เบส ในทุกแปลงอ้อยที่สำรวจพบการติดเชื้อไวรัสถึง 95-100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการตรวจเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* ไม่พบการติดเชื้อในตัวอย่างอ้อย จากการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างในอ้อยจากตัวอย่างที่สำรวจในแต่ละจังหวัด พบว่า เป็นเชื้อไวรัส *Sugarcane streak mosaic virus* จากการจำแนกชนิดเชื้อไวรัสตัวอย่างอ้อยจาก ตำบลโคกสะอาด อำเภอภูเขียว จังหวัดชัยภูมิ มีความคล้ายคลึงกับเชื้อไวรัส *Sugarcane streak mosaic virus* ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ตำบลหินโคน อำเภอจักราช จังหวัดนครราชสีมา มีความคล้ายคลึง 92 เปอร์เซ็นต์ ตำบลหินโคน อำเภอลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์ มีความคล้ายคลึง 93 เปอร์เซ็นต์ ตำบลบ้านมะเกลือ อำเภอตะเคียนเลือน จังหวัดนครสวรรค์ มีความคล้ายคลึง 93 เปอร์เซ็นต์ ตำบลนครชุม อำเภอเมือง จังหวัดกำแพงเพชร มีความคล้ายคลึง 93 เปอร์เซ็นต์ ตำบลจรเข้สามพัน อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี มีความคล้ายคลึง 95 เปอร์เซ็นต์ และตำบลท่าไม้ อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี มีความคล้ายคลึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) พิสสวรรณ และปวีณา (2554) และ Chatenet *et al.* (2005) ที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ว่าตรวจพบเชื้อดังกล่าวในอ้อยที่ปลูกในประเทศไทยใน ปี 2548 เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อไวรัสโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส SCSMV ที่ตรวจพบในแต่ละจังหวัดมีความใกล้ชิดกันแต่พบว่า เชื้อไวรัสจากตัวอย่างอ้อยจากจังหวัดนครสวรรค์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ห่างไกลกว่าจังหวัดอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลเชื้อพันธุกรรมไวรัส KP987848.1 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) สอดคล้องกับการศึกษาของ ปวีณาและคณะ (2554) ได้รายงานการตรวจ

พบเชื้อ SCSMV ในอ้อยจากหลายจังหวัดและเชื้อทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ SCMV-PAK ที่พบในอ้อยจากประเทศปากีสถาน ทั้งนี้การตรวจจับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณต่ำมาก ๆ ได้ เนื่องจากเทคนิค RT-PCR ที่มีความไวและความจำเพาะของ coat protein gene (ยีน CP) ที่ออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสชนิดนี้ทำให้การตรวจวินิจฉัยได้ง่ายขึ้นเนื่องจากปัจจุบันพบอาการใบด่างค่อนข้างมากในแปลงปลูกอ้อยที่มีการใช้ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีการติดเชื้อและพบในระยะอ้อยตอเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดการละเลยยังไม่ได้ให้ความสำคัญกับอาการใบด่าง จึงทำให้ขาดความตระหนักและขาดความระมัดระวัง ยังคงมีการขยายพันธุ์อ้อยที่มีอาการดังกล่าวไปปลูกในฤดูกาลถัดไปอีก ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โรคใบด่างยังคงระบาดอย่างแพร่หลายในประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน โดยที่ความรุนแรงของโรคนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยจากสภาพแวดล้อม การศึกษาถึงชนิดของเชื้อที่พบได้ในอ้อยที่มีอาการใบด่างในแหล่งปลูกสำคัญของไทย การตรวจพบเชื้อดังกล่าวในอ้อยจะทำให้การควบคุมและลดพื้นที่ระบาดของโรคได้มากขึ้น สามารถจัดการโรคได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น การตรวจหาเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในตัวอย่างใบอ้อยที่เก็บจากท่อนลำเดียวกันพบว่า ให้ผลบวก จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพร์เมอร์ SCSMV CPF/SCSMV CPR ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 572 bp และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส SCSMV ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับข้อมูลของ KP987848.1 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ การโคลนยีนเขา pGEM®-T easy vector เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอของยีน (DNA sequencing) ขั้นตอนแรกเป็นการเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอารขนาด 572 bp กับ pGEM®-Teasy ด้วยเอนไซม T4 DNA ligase และเคลื่อนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยชนิด *E.coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock ผลการทดลองได้รีคอมบิแนนท์เซลล์ประมาณ 300 โคโลนี ทำการคัดแยกรีคอมบิแนนท์เซลล์ด้วยวิธี blue-white screening เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว จำนวน 24 โคลน สกัดพลาสมิดนำมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส และพบวามีเพียง 5 รีคอมบิแนนทเซลล์ ได้แกรีคอมบิแนนทเซลล์ หมายเลข 4 8 15 18 และ 19 ตรวจพบยีนขนาด 572 bp ตามที่ต้องการจึงทำการตรวจสอบลำดับเบส ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนพบว่ามีความคล้ายคลึงถึง *Sugarcane streak mosaic virus* ถึง 98 เปอร์เซ็นต์

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในงานวิจัยนี้ ทำโดยการเทียบปริมาณเชื้อในตัวอย่างอ้อยกับ กราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้นพลาสมิด SCSMV-CP ต่างกัน 10 เท่าระหว่าง 10^{10}-1 copies ในดีเอ็นเอ ของอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 25 ng/µl (10^{10}-1 copies /25 ng plant DNA) พบว่าเส้นกราฟของความเข้มข้นพลาสมิด 10^{10} copies/25 plant DNA แสดงเส้นกราฟได้เร็วกว่าความเข้มข้นข้นอื่น ๆ มีค่า Threshold cycles (Ct) น้อยกว่าความเข้มข้นอื่น ๆ และมีค่า Ct เพิ่มขึ้นผกผันกับความเข้มข้นพลาสมิด SCSMV-CP (Figure 4 A) ขณะที่ความเข้มข้น พลาสมิด SCSMV-CP ต่ำ (10^{-1} copies/25 ng plant DNA) สามารถเพิ่ม ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้แต่กราฟขึ้นไม่ชัดเจน เมื่อพิจารณาค่า Tm ของแต่ละความเข้มข้นให้ค่าเฉลี่ยที่ประมาณ 84.45 องศาเซลเซียส เพียงค่าเดียวเท่านั้นจึงน่าจะเป็นค่า Tm ของชิ้นดีเอ็นดีเป้าหมาย (Figure 4 B) ค่า PCR amplification efficiency (E) จากการคำนวณด้วยซอฟแวร์ Abs Quant/2nd Derivative Max พบว่าระหว่างช่วงความเข้มข้นพลาสมิด SCSMV-CP 10^{10}- 10 copies/25 ng plant DNA สามารถมาใช้หาความลาดเอียงของกราฟมาตรฐานได้ ส่วนความเข้มข้นพลาสมิด SCSMV-CP 10^{-1} copies/25 ng plant DNA เป็นค่าที่ตกอยู่ในช่วงไม่น่าเชื่อถือ จากกราฟนี้พบว่าได้ค่าความลาดเอียงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ -2.197 ความหมายคือแต่ละความเข้มข้นที่ต่างกัน 10 เท่า ให้ค่า Ct ต่างกัน 2.197 รอบ หรือกล่าวได้

ว่าเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น 2.197 สามารถการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียง 10 เท่า (23.524 = 11.5) เมื่อนำค่าความลาดเอียงมาหาค่า E จากสมการ $E = 10^{(-1/slope)}$ ได้ค่า E เท่ากับ 2.853 (Figure 4 C) แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวน 2.853 เท่า ในแต่ละรอบของการทำพีซีอาร์

เมื่อนำท่อนอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีอาการใบด่างที่ผ่านการตรวจยืนยันเชื้อไวรัส แช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ ตามกรรมวิธี การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิของน้ำร้อนและระยะเวลาการแช่ต่ออัตราการงอกของอ้อย พบว่า ท่อนอ้อยที่ติดเชื้อไวรัสจะมีอัตราการงอกที่ต่ำกว่าท่อนอ้อยปกติ โดยมีอัตราการงอกที่ 85.96 เปอร์เซ็นต์ และการแช่น้ำร้อนที่ระยะเวลา 2 3 และ 5 ชั่วโมง มีผลต่ออัตราการงอก 10 – 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอ้อยที่ไม่ติดเชื้อจะมีอัตราการงอกเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่อ้อยอายุ 3 เดือนหลังงอก (Table 2) เมื่อประเมินการเกิดโรคและตรวจปริมาณเชื้อในต้นอ้อย พบว่า ท่อนอ้อยที่แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ไม่พบการแสดงอาการของโรคใบด่างเมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ พบว่า ไม่พบเชื้อ รองลงมา คือ ท่อนอ้อยที่แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นแช่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ไม่พบการแสดงอาการของโรคใบขีดด่างแต่ยังสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อ 36 copies เปรียบเทียบกับท่อนอ้อยที่แช่น้ำอุณหภูมิห้องพบการแสดงอาการถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ตรวจพบปริมาณเชื้อถึง 8.2×10^8 copies (Table 3)

สรุปผลการทดลอง

การสำรวจและตรวจชนิดเชื้อสาเหตุโรคใบด่างในอ้อย ดำเนินการสำรวจในแหล่งปลูกอ้อย 7 จังหวัด ทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันตกของไทย ในปี 2563 สามารถสำรวจและรวบรวมตัวอย่างอ้อยที่มีอาการคล้ายโรคนี้ได้ทั้งสิ้น 158 ตัวอย่าง ผลการตรวจเชื้อไวรัส SCSMV จากตัวอย่างใบด้วยเทคนิค RT-PCR มีตัวอย่างที่ให้ผลบวกคิดเป็นร้อยละ 94 ซึ่งส่วนใหญ่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ในอัตราที่สูง ทำให้อาจเป็นแหล่งแพร่กระจายเชื้อ จึงควรเพิ่มการคัดเลือกและจัดการท่อนพันธุ์ เพื่อลดความเสี่ยงในการแพร่กระจายโรคที่จะทำให้เกิดความเสียหายมากขึ้น โดยเฉพาะแหล่งที่มีความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคที่สำคัญของอ้อยในประเทศไทย การทดสอบการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อไวรัสสาเหตุใบด่างในท่อนพันธุ์อ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพเป็นแนวในการกำจัดและป้องการแพร่กระจายของโรคได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณสำหรับการดำเนินการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ปวีณา เกษมสินธุ์. 2559. การตรวจวินิจฉัยและการแพร่กระจายในแปลงปลูกของเชื้อ Sugarcane streak mosaic virus สาเหตุโรคใบด่างขีดอ้อยในประเทศไทย. *วิทยาศาสตร์เกษตร*. 47(1): 93-102.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ และปวีณา เกษมสินธุ์. 2554. การตรวจพบเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* ในข้าวโพด. น. 266-270. *ใน*: การประชุมวิชาการข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ 24-27 พ.ค. 2554. กรุงเทพฯ.

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล วิวัฒน์ ภาณุ และปรียพรรณ พงศาทิชณ์. 2554. การเฝ้าระวังการแพร่ระบาดโรคไวรัสของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ PVA, PVM, PVT, PVX, PVS และ PLRV. น. 1699-1704 *ใน*: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สุนี ศรีสิงห์, วัลลิภา สุชาโต และวาสนา ยอดปรางค์. 2557. ศึกษาปฏิกิริยาของอ้อยโคลนดีเด่นต่อโรคใบขีดด่างของอ้อย. รายงานผลงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร ผลงานวิจัยและพัฒนาปี 2557. กรมวิชาการเกษตร.

Damayanti, T.A., and L.K. Putra 2011. First occurrence of *Sugarcane streak mosaic virus* infecting sugarcane in Indonesia. *Journal of General Plant Pathology*. 77: 72-74.

Daugrois, J.H., P. Roumagnac, Y. Kouakou, O.J.D.T. Oura and J.S. Pita, 2020. First report of *Sugarcane streak mosaic virus* in sugarcane (*Saccharum* spp.) in Côte d'Ivoire. New Disease Reports. 41, 22. http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.022.

Gemechu A.L., P. Chiemsombat, S. Attathom, K. Reanwarakorn and R. Lersrutaiyotin 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *Sugarcane mosaic virus* isolated from sugarcane and maize in Thailand. *Arch Virol*. 151:167–172.

Kasemsin, P., P. Chiemsombat and R. Hongprayoon, 2011. New virus disease of sugarcane in Thailand caused by *Sugarcane streak mosaic virus*. The NRCT-Proceedings of Thailand Research Expo 2011. August 26-30. 2011. Bangkok Convention Central World, Bangkok, Thailand.

Putra, L. K., A. Kristini, E. M. Achadian, and T. A. Damayanti. 2014. *Sugarcane streak mosaic virus* in Indonesia: distribution, characterization, yield losses and management approaches. *Sugar Tech*, 16: 392-399.

Zambrano, A.Y., J. R. Demey, M. Fuchs, V. González, R. Rea, O. De Sousa, and Z. Gutierrez. 2003. Selection of sugarcane plants resistant to SCMV. *Plant Sci*. 165: 221–225.

Table 1 Surveying and detection of streak mosaic disease from Sugarcane plantations.

No.	Sampling location	Locality coordinating		Varieties	RT-PCR Detection	
		Lat. (N)	Lon. (E)		SCSMV	SCMV
1	Phu khiao, Chaiyaphum	16.471984	102.126250	KK3	20/22	0/22
2	Chakkarat, Nakhon Ratchasima	15.026325	102.502596	KK3	22/23	0/23
3	Lamplaimat, Buriram	15.056030	102.793479	LK92-11	22/22	0/22
4	Tak Fa, Nakhonsawan	15.784692	100.088158	LK92-11	19/24	0/24
5	Mueang, Kampheang Phet	16.458392	99.502461	LK92-11	22/22	0/22
6	U Thong, Suphan buri	14.3020739	99.8611160	LK92-11	22/22	0/22
7	Tamaka, Kanchanaburi	13.9104855	99.8096172	LK92-11	23/23	0/23

Table 2 The Efficacy of hot water treatment to germination of sugarcane.

Treatment	Germination of sugarcane	
	Healthy	Streak mosaic
RT[1]/1 hr	100.00a	85.96b
50 C°/2 hr	89.83b	87.14ab
50 C°/ 3 hr	72.20c	65.35c
50 C°/5 hr	62.13d	60.74d
DHWT[2]	90.54b	89.23a
C.V. (%)	**2.7**	**2.1**

[1]Room temperature

[2]Dual hot water treatment (52 C°/30 min and 50 C°/2 hr)

Table 3 Detection of SCSMV from sugarcane samples from hot water treatment by qRT-PCR.

Treatment	Percentage of disease	qRT-PCR		
		Ct value	Copies/µl	Result
Control disease	100.00b	13.35	8.2×10^{8}	+
50 C°, 2 hr	90.56b	18.75	3.7×10^{5}	+
50 C°, 3 hr	15.12a	39.14	2.1×10^{2}	+
50 C°, 5 hr	0.00a	Undetermined	0	-
(DHWT) 52 C°, 30 min and 50 C°, 2 hr	0.00a	Undetermined	36	+
Control healthy	0.00a	Undetermined	0	-
C.V. (%)	**15.23**			

*Positive result (+), negative result (–). Ct = Cycle threshold

Figure 1 Symptoms of streak mosaic disease in sugarcane plantation.

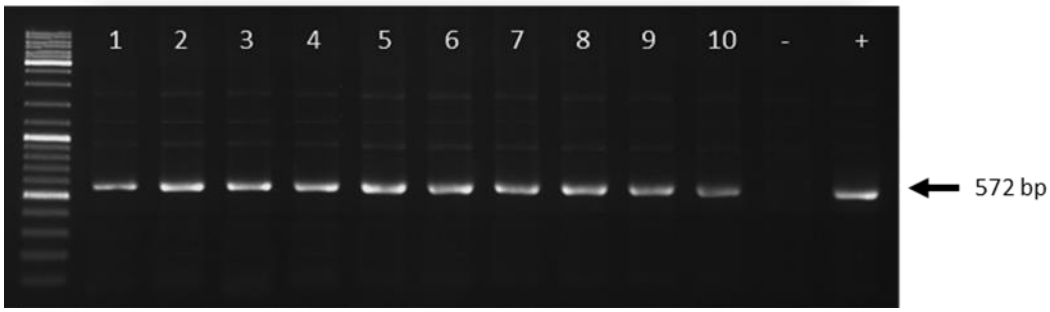

Figure 2 PCR amplification of SCSMV cDNA from sugarcane streak mosaic disease sugarcane sample = 1-10, negative and positive(using PCR primers amplifying CP sequences and expected to Generate a 572 bp specific product by RT-PCR were analysed by electrophoresis in 1.5 % agarose.

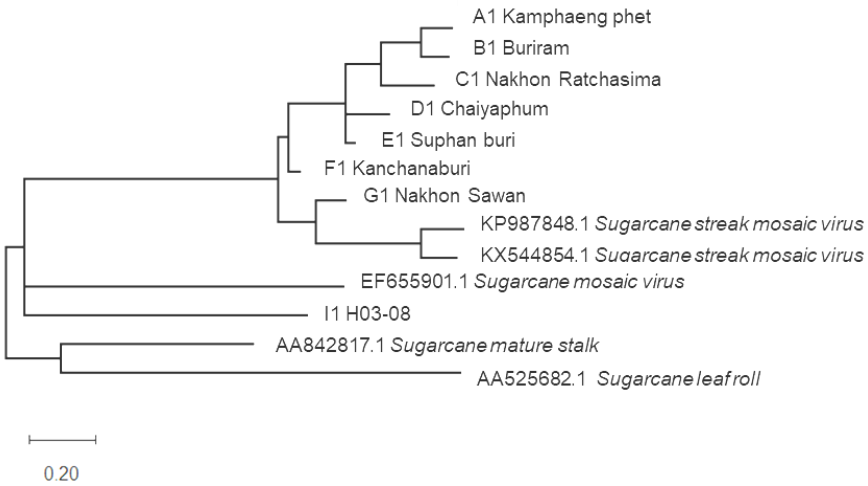

Figure 3 Phylogenetic tree analysis of SCSMV base on the CP sequences. Phylogenetic analyses were performed by the neighborjoining method using MEGA version 4 (www.megasoftware.net). Bootstrap probabilities of each node were calculated with 1000 replicates.

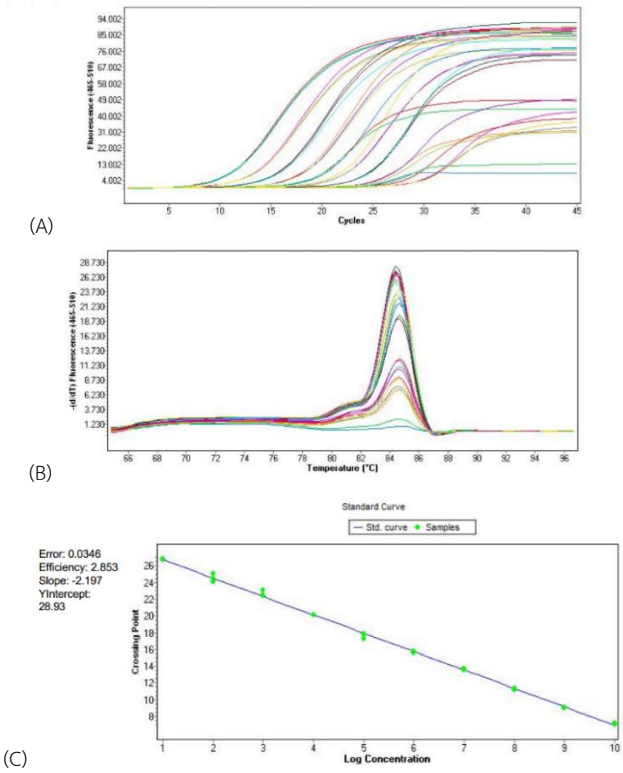

Figure 4 (A) Amplification curve of serial dilution; SCSMV-CP plasmid concentration ranging from 10^{10}-1 copies/25 ng plant DNA, (B) The melting temperature (Tm) peak at 84.45 °C, indicate specific amplification of target DNA, (C) Standard curve of serial dilution mixes obtained by the threshold cycler (Ct) versus log of starting quantity (copies/25 ng plant DNA).