ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: https://www.researchgate.net/publication/360032937

Control of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane by hot water treatment

Conference Paper · April 2022

CITATIONS
0

READS
36

5 authors, including:

Weerakorn Saengsai
Khon Kaen Field Crops Research Center
4 PUBLICATIONS **0** CITATIONS

SEE PROFILE

Nattapat Khumla
Nakhon Sawan Field Crops Research Center
3 PUBLICATIONS **7** CITATIONS

SEE PROFILE

Suchirat Sakuanrungsirikul
Khon Kaen Field Crops Research Center
24 PUBLICATIONS **171** CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:

Project Detection of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane in Thailand using RT-PCR techniques View project

Project Detection of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane in Thailand using RT-PCR techniques View project

All content following this page was uploaded by Weerakorn Saengsai on 19 April 2022.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

วารสารแก่นเกษตร

Khon Kaen Agriculture Journal SUPPL.
Agricultural Conference
Journal Home Page : https://ag2.kku.ac.th/kaj

JOURNAL KAJ

การกำจัดโรคใบขีดด่างอ้อยจากเชื้อไวรัส *Sugarcane streak mosaic virus* ในท่อนพันธุ์อ้อยโดยการใช้น้ำร้อน

Control of *Sugarcane streak mosaic virus* in sugarcane by hot water treatment

วีรกรณ์ แสงไสย์[1]*, เบญจวรรณ รัตวัตร[1], รวีวรรณ เชื้อกิตติศักดิ์[2], นัฐภัทร์ คำหล้า[3] และ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1]

Weerakorn Seangsai[1]*, Benjawan Ruttawat[1], Raweewan Chuekittisak[2], Nattapat Khumla[3] and Suchirat Sakuanrungsirikul[1]

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
[1] Khon Kaen Field Crop Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Muang, Khon Kaen
[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภอสว่างวีระวงศ์ จังหวัดอุบลราชธานี
[2] Ubon Ratchathani Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Sawangweerawong, Ubon Ratchathani
[3] ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์
[3] Nakhon Sawan Field Crop Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, TakFa , Nakhon Sawan

บทคัดย่อ: โรคใบขีดด่างเกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) จัดจำแนกอยู่ในจีนัส Poacevirus (family Potyviridae) ทำให้อ้อยมีลักษณะอาการใบด่างและมีการเจริญเติบโตที่ช้ายังสามารถติดไปกับท่อนพันธุ์ได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์อ้อยโดยวิธีการแช่ในน้ำร้อนและตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในต้นอ้อยหลังการทดสอบ ผลการแช่น้ำร้อนในการกำจัดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบขีดด่าง พบว่า กรรมวิธีที่แช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 ชั่วโมง อ้อยไม่แสดงอาการใบขีดด่างและตรวจไม่พบเชื้อไวรัส ส่วนที่อุณหภูมิ 52 °C นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำร้อน 50 °C นาน 2 ชั่วโมง อ้อยไม่แสดงอาการใบขีดด่างแต่ยังสามารถตรวจเชื้อไวรัสเพียง 36 copies เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่แช่น้ำร้อนพบเชื้อไวรัส 8.2 x 10^8 copies ซึ่งวิธีดังกล่าวสามารถกำจัดเชื้อไวรัสสาเหตุใบขีดด่างในท่อนพันธุ์อ้อยได้ จากการวิจัยนี้พบว่าการแช่น้ำร้อนในระยะที่ยาวนานทำให้อ้อยมีอัตราการงอกที่ลดลง ถึง 40%
คำสำคัญ: ใบขีดด่าง; ไวรัส; แช่น้ำร้อน; อ้อย; การกำจัดโรค

ABSTRACT: Streak mosaic disease of sugarcane caused by *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) is a member of the genus Poacevirus (family Potyviridae). SCSMV will be streak mosaic symptom, abnormally growth and transmitted by vegetative propagation. The objective of this study was to using hot water treatment (HWT) method for control of SCSMV disease in seed cane and detection of streak mosaic virus after HWT method. The results showed the hot water treatment to eliminate the virus found that the process by hot water at 50 °C for 5 hours showed no symptoms of disease, while at 52 °C for 30 min and at 50 °C for 2 hours No streak symptoms of leaf but was 36 copies of virus detection comparison with control disease showed 100% of streak mosaic symptom and SCSMV infection was 8.2x10^8 copies. This method can eliminate the virus in sugarcane. In this study we found that long periods of hot water treatment reduced of germination rates of sugarcane by 40%.
Keywords: streak mosaic disease; virus; hot water treatment virus; Sugarcane; Control.

* Corresponding author: weerakorn.saengsai@gmail.com

บทนำ

โรคใบขีดด่างเกิดจากเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) มีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาด 890 x 15 นาโนเมตร มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวแบบ positive sense ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ได้จัดจำแนกอยู่ในจีนัส Poacevirus (Xu et al., 2010; Kasemsin et al., 2016) เนื่องจากจีโนมของเชื้อไวรัส SCSMV มีความแตกต่างจากเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) ที่อยู่ในจีนัส Potyvirus เชื้อ SCSMV มีพืชอาศัย ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่าง หญ้าปากควาย (Damayanti and Pura, 2011) รายงานครั้งแรกในประเทศปากีสถานเมื่อปี ค.ศ. 1998 และได้มีการสำรวจในอินโดนีเซีย ระหว่างปีค.ศ. 2008-2009 พบการระบาดมากกว่า 30 % ในพื้นที่ 28 โรงงาน พบว่าพันธุ์ PS 864 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอที่สุด มีการทดลองความเสียหายผลผลิตพบว่า เมื่อเกิดโรคเท่ากับหรือมากกว่า 50 % ทำให้ผลผลิตน้ำตาลเสียไป 20 % โรคนี้สามารถติดต่อไปกับท่อนพันธุ์และมีดตัดอ้อยได้ ไม่มีรายงานถึงแมลงพาหะ โดยพืชมีอาศัย ได้แก่ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และหญ้า *Dactyloctenium aegyptium* (Putra et al., 2013; สุนี และคณะ, 2557) ในประเทศไทยมีรายงานการระบาดครั้งแรกในปี 2548 ในเขตจังหวัดนครปฐม โรคนี้มีลักษณะอาการคล้ายโรคใบด่างที่เกิดจากไวรัส SCMV โดยเฉพาะที่ใบยอด เนื่องจากในปัจจุบันมีการพบอาการใบด่างมากขึ้นกับอ้อยหลายพันธุ์ เช่น สุพรรณบุรี 50 อู่ทอง 8 และพันธุ์อื่นๆ (สุนีย์ และคณะ, 2557) อาการใบอ้อยจะด่างเป็นรอยขีดสั้น ๆ สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ เมื่อนำใบส่องผ่านแสงแดดจะเห็นรอยด่างชัดเจน อาการต่าง ๆ ปรากฏบนใบอ่อนเห็นชัดเจนกว่าที่ใบแก่ ในพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคอาจปรากฏรอยขีดด่างบนลำอ้อยด้วย ในการศึกษาของ Kasemsin et al. (2011) ได้ตรวจพบเชื้อ SCSMV ในตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบด่างขีดที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม โดยใช้วิธี RT-PCR รวมทั้งวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูงสุดที่ 97 % กับเชื้อ SCSMV-JP1 จากประเทศจีน สอดคล้องกับการรายงานของ วีรกรณ์ และคณะ (2564) ได้สำรวจโรคใบขีดด่างในแปลงอ้อยพื้นที่ 7 จังหวัด ได้แก่ กำแพงเพชร นครสวรรค์ ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี ตรวจติดตามเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบการติดเชื้อไวรัสใบขีดด่าง ถึง 60 % ถึง 94 % ในการป้องกันกำจัดโรคใบขีดด่างสำหรับวิธีกำจัดที่ดีที่สุดคือ การใช้พันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค การขยายพันธุ์อ้อยที่ให้สะอาดโดยการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยน้ำร้อนสามารถป้องกันกำจัดโรคในท่อนพันธุ์ได้ สุนี และคณะ (2557) ได้ทดสอบการแช่น้ำร้อนในท่อนพันธุ์อ้อยสามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวได้ แต่การใช้เวลานานทำให้ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยลดลง การแช่ท่อนพันธุ์อ้อยสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้เมื่ออ้อย 1-2 เดือน และเมื่อนำต้นกล้าที่ไม่แสดงอาการไปปลูกต่ออ้อยปลูกไม่แสดงอาการใบขาวจนถึง 10 เดือน เมื่อนำอ้อยที่ผ่านกรรมวิธีการแช่น้ำร้อนแล้วอายุ 7 เดือน ไปตรวจสอบการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว พบว่าการแช่น้ำร้อน 2 ครั้งหรือ Dual hot water treatment (DHWT) ไม่แตกต่างจากการแช่ที่ 50 C° นาน 2 ชั่วโมงเพียง 1 ครั้ง ในท่อนพันธุ์ที่ไม่แสดงอาการของโรคจากแปลงที่เป็นโรคใบขาว เมื่อนำมาผ่านกรรมวิธีแช่น้ำร้อนสามารถลดเชื้อไฟโตพลาสมาได้ Damayanti and Putra (2010) ได้ทดสอบการใช้น้ำร้อนแช่ท่อนพันธุ์อ้อยเพื่อกำจัดเชื้อไวรัส SCSMV โดยทดสอบแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่ติดเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิ 50 C°, 55 C°, 60 C° และ 65 C° นาน 10 นาที จากนั้นนำน้ำคั้นอ้อยมาตรวจติดตามเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบว่า ท่อนพันธุ์อ้อยที่แช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 C° และ 55 C° สามารถตรวจเจอเชื้อไวรัส ส่วนอุณหภูมิ 60 C° และ 65 C° ตรวจไม่พบเชื้อ ในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัดเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์อ้อยโดยวิธีการแช่ในน้ำร้อนและตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในต้นอ้อยหลังการทดสอบแช่ในน้ำร้อน และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการกำจัดเชื้อไวรัสดังกล่าวในท่อนพันธุ์อ้อย เพื่อเป็นวิธีการจัดการท่อนพันธุ์ให้มีความสะอาดก่อนนำไปปลูกเพื่อควบคุมการระบาดของโรคนี้

วิธีการศึกษา

1.เก็บตัวอย่างอ้อยที่มีอาการใบขีดด่าง

เก็บตัวอย่างอ้อยใบและท่อนพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 8 เดือน จากแปลงเกษตรกรใน ต.หินโคน อ.ลำปลายมาศ จ.บุรีรัมย์ ที่แสดงอาการใบขีดด่าง สังเกตอาการด่างเป็นรอยขีดสั้นๆ สีเขียวอ่อนสลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ ใบเป็นฝอย มีสีเขียวซีดแล้วเปลี่ยนเป็นเขียวอมเหลือง สีเหลือง สีขาวปนเหลือง และสีขาวซีด โดยเก็บตัวอย่างใบอ้อยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจยืนยันและตรวจปริมาณเชื้อเริ่มต้น

2.การตรวจเชื้อไวรัสใบขีดด่าง

สกัดอาร์เอ็นเอ: สกัดอาร์เอ็นเอโดยชุด RNeasy Plant Mini kit (OIAGEN) ตัดใบอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และบดใบอ้อยโดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม ด้วยโกร่งจนได้เป็นผงละเอียดสีเขียวถ่ายผงใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลาย RLT buffer 450 µl ลงในหลอด ผสมอย่างแรงให้เข้ากันทันที ดูดสารผสมที่ได้ใส่ลงในคอลัม QIA shredder spin ปั่นด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาทีดูดของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอดใหม่ เติม 96% เอธานอลปริมาตรครึ่งเท่าผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารผสมที่ใส่ในคอลัมน์ RNeasy Mini spin ปั่นด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วินาที เก็บคอลัมน์ไปทำต่อ เติมบัฟเฟอร์ RW1 700 µl ลงในคอลัมน์ปั่นด้วย ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที ทิ้งของเหลวเก็บคอลัมน์ไปทำต่อ จากนั้นนำคอลัมน์ที่ได้ไปเติมบัฟเฟอร์ RPE 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ปั่นด้วย ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที ทิ้งของเหลว เก็บคอลัมน์ไปทำต่อ เติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอรวมโดยตรวจวิเคราะห์ด้วย 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

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 C° 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 GCAGAWGCAACRGCACAA GC'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 C° 1 นาที, 55 C° 1 นาที, 72 C° 1 นาที และตามด้วย 72 C° 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

การโคลนยีน: เตรียมตัวอย่าง DNA ยีนเป้าหมายบริเวณ coat protein gene 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 C° นาน 16 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวมา steak ในอาหาร แข็ง LB ที่มี 50 mg/L แอมพิซิลลิน และ เขี่ยเชื้อส่วนที่เหลือมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ ได้ รับยีนเข้าไปตรวจสอบยีนโดยวิธี PCR ที่ใช้ คู่ primer SCSMV-CPF/ SCSMV-CPR แล้วนำผลผลิต PCR ตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis นำเชื้อไปเลี้ยงเพิ่มจำนวน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 C° ในกลีเซอรอล 50 % สำหรับใช้เป็นตัวอย่าง ควบคุมต่อไป

การทดสอบหาปริมาณยีน SCSMV-CP ด้วย qRT-PCR: เตรียมดีเอ็นเอยีน 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'TTCGGCAATCTCACTGGTCTG'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 C° 30 วินาที, 55 C° 45 วินาที, 72 C° 45 วินาที และตามด้วย 72 C° 10 นาที จำนวน 3 ซ้ำ ตามกรรมวิธีการทดสอบ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR หาค่าระดับต่ำที่สุดของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ และนำเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนระดับต่ำที่สุดนั้นมาหาจำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจ

3. การใช้น้ำร้อนในการกำจัดเชื้อโรคใบขีดด่างในท่อนพันธุ์อ้อย

นำตัวอย่างอ้อยที่มีอาการใบขีดด่างมาตรวจติดตามและตรวจหาปริมาณเชื้อไวรัสตั้งต้นด้วยวิธี qRT-PCR มีระดับปริมาณเชื้อเท่ากัน จากนั้นนำลำอ้อยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างข้างต้นตัดท่อนพันธุ์ขนาด 1 ตา และนำท่อนพันธุ์ไปแช่ในน้ำร้อนตามกรรมวิธีของ สุนี และคณะ 2557 โดยวางแผนการทดลอง แบบ factorial in RCB 2 ปัจจัย 4 ซ้ำ ๆ ละ 3 ตาปัจจัยที่ 1 คือ 1) ท่อนอ้อยติดเชื้อ 2) ท่อนอ้อยสะอาด ปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการแช่น้ำร้อน 5 วิธี ได้แก่ 1) ที่ 52 C° นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำร้อน 50 C° นาน 2 ชั่วโมง (DHWT) 2) ที่ 50 C° นาน 2 ชั่วโมง 3) ที่ 50 C° นาน 3 ชั่วโมง 4) ที่ 50 C° นาน 5 ชั่วโมง 5) แช่น้ำเย็น 1 ชั่วโมง เป็นกรรมวิธีควบคุม เพาะชำท่อนพันธุ์ดังกล่าวในกระถาง อ้อยอายุประมาณ 3 เดือน ตรวจเช็คความงอก อาการใบด่าง ตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยวิธี real-time PCR

ผลการศึกษา

ตรวจหาเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในตัวอย่างใบอ้อยที่เก็บจากท่อนลำเดียวกัน พบว่า ให้ผลบวก จากการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอ จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพร์เมอร์ SCSMV CPF /SCSMV CPR ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 572 bp **(Figure 1)** และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส SCSMV ที่ตรวจพบเปรียบเทียบกับข้อมูลของ KP987848.1 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 98 % **(Figure 1)**

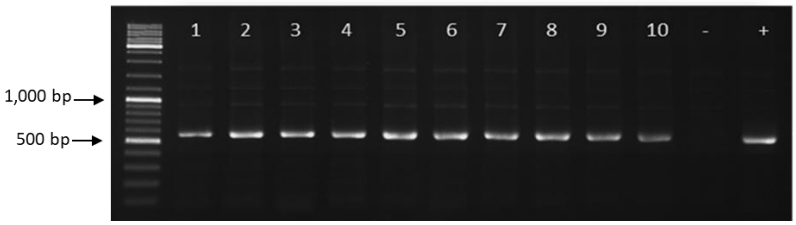

Figure 1 PCR amplification of SCSMV cDNA from sugarcane streak mosaic disease (sugarcane sample = 1-10, negative and positive) using PCR primers amplifying CP sequences and expected to Generate a 572 bp specific product by RT-PCR were analysis by electrophoresis in 1.5% agarose.

การโคลนยีนเข้า pGEM®-T easy vector เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอของยีน (DNA sequencing) ขั้นตอนแรกเป็นการเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 572 bp กับ pGEM®-Teasy ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase และเคลื่อนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ ให้อาศัยชนิด *E.coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock ผลการทดลองได้รีคอมบิแนนท์เซลล์ประมาณ 300 โคโลนี ทำการคัดแยกรีคอมบิแนนท์เซลล์ด้วยวิธี blue-white screening เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว จำนวน 24 โคลน สกัดพลาสมิดนำมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส และ

พบว่ามีเพียง 5 รีคอมบิแนนท์เซลล์ได้แก่รีคอมบิแนนท์เซลล์หมายเลข 4, 8, 15, 18 และ 1**9** ตรวจพบยีนขนาด 572 bp ตามที่ต้องการ จึงทำการตรวจสอบลำดับเบส ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีนพบว่า มีความคล้ายคลึงถึง *Sugarcane streak mosaic virus* ถึง 98 %

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในงานวิจัยนี้ทำโดยการเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในตัวอย่างอ้อยกับ 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 แสดงเส้นกราฟได้เร็วกว่าความเข้มข้นข้นอื่นๆ มีค่า Threshold cycles (Ct) น้อยกว่าความเข้มข้นอื่นๆ และมีค่า Ct เพิ่มขึ้นผกผันกับความเข้มข้นพลาสมิด SCSMV-CP **(Figure** 2**A)** ขณะที่ความเข้มข้น พลาสมิด SCSMV-CP ต่ำ (10^{-1} copies/25 ng plant DNA) สามารถเพิ่ม ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ แต่กราฟขึ้นไม่ชัดเจน เมื่อพิจารณาค่า Tm ของแต่ละความเข้มข้นให้ค่าเฉลี่ยที่ประมาณ 84.45 °C เพียงค่าเดียวเท่านั้นจึงน่าจะเป็นค่า Tm ของชิ้นดีเอ็นดีเป้าหมาย **(Figure** 2**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 หรือกล่าวได้ว่าเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น 2.197 สามารถการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียง 10 เท่า (23.524 = 11.5) เมื่อนำค่าความลาดเอียงมาหาค่า **E** จากสมการ E = 10 $^{(-1/slope)}$ ได้ค่า **E** เท่ากับ 2.853 **(Figure 1C)** แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของชิ้นดีเอ็นเอได้ จำนวน 2.853 เท่าในแต่ละรอบของการทำพีซีอาร์

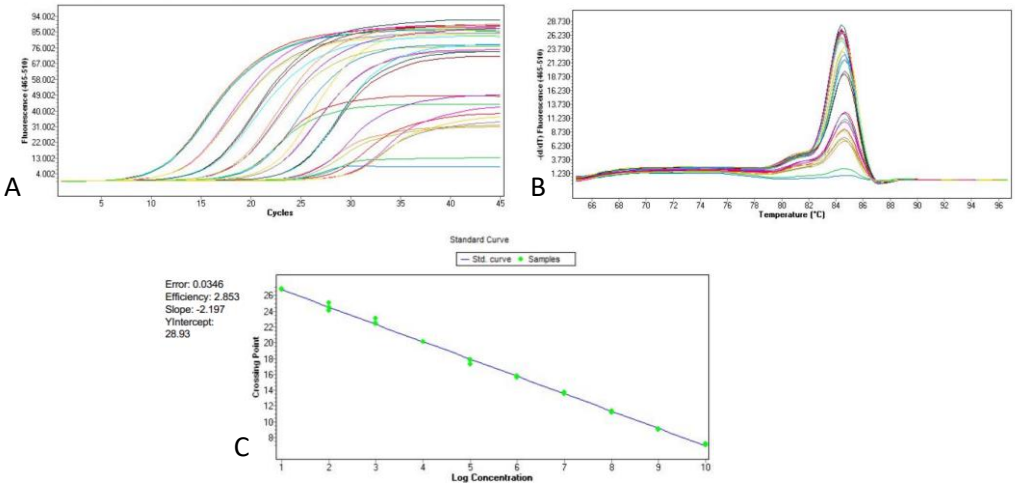

Figure 2 (A) Amplification curve of serial dilution; SCSMV-CP plasmid concentration ranging from 10^{10}-1 copies/25 ng plant DNA, (B) The melting temperature (Tm) peak at 84.45 °C, indicate specific amplification of target DNA, (C) Standard curve of serial dilution mixes obtained by the threshold cycler (Ct) versus log of starting quantity (copies/25 ng plant DNA).

เมื่อนำท่อนอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีอาการใบขีดด่างที่ผ่านการตรวจยืนยันเชื้อไวรัส มาแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ตามกรรมวิธี การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิของน้ำร้อนและระยะเวลาการแช่ต่ออัตราการงอกของอ้อย พบว่าท่อนอ้อยที่ติดเชื้อไวรัสจะมีอัตราการงอกที่ต่ำกว่าท่อนอ้อยปกติ โดยมีอัตราการงอกที่ 85.96% และการแช่น้ำร้อนที่ระยะเวลา 2 3 และ 5 ชั่วโมง มีผลต่ออัตราการงอก 10 - 40% ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอ้อยที่ไม่ติดเชื้อจะมีอัตราการงอกเฉลี่ย 100 % ที่อ้อยอายุ 3 เดือนหลังงอก (**Table 1**) เมื่อประเมินการเกิดโรคและตรวจปริมาณเชื้อในต้นอ้อย พบว่าท่อนอ้อยที่แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 50 C° นาน 5 ชั่วโมง ไม่พบการแสดงอาการ

ของโรคใบขีดด่างเมื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไวรัส พบว่าไม่พบเชื้อไวรัส รองลงมา คือ ท่อนอ้อยที่แช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 C° นาน 30 นาที จากนั้นแช่ที่อุณหภูมิ 50 C° นาน 2 ชั่วโมง ไม่พบการแสดงอาการของโรคใบขีดด่างแต่ยังสามารถตรวจพบปริมาณเชื้อไวรัส 36 copies เปรียบเทียบกับท่อนอ้อยที่แช่น้ำอุณหภูมิห้องพบการแสดงอาการถึง 100 % ตรวจพบปริมาณเชื้อถึง 8.2 x 10^8 copies

Table 1 The Efficacy of hot water treatment to germination of sugarcane.

Treatment	Hot water treatment					Average.
	RT[1]/1 hr	50 C°/2 hr	50 C°/ 3 hr	50 C°/5 hr	DHWT[2]	
Healthy	100.00	89.83	72.20	62.13	90.54	82.94
Streak mosaic	85.96	87.14	65.35	60.74	89.23	77.68
Average.	92.98a	88.48b	68.77c	61.43d	89.88ab	

[1]Room temperature

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

Table 2 Detection of SCSMV from sugarcane samples from hot water treatment by real-time qRT-PCR.

Treatment	Percentage of disease	qRT-PCR		
		Ct value	Copies/µl	Result
Control disease	100.00b	13.35	8.2 x 10^8	+
50 C°, 2 hr	90.56b	18.75	3.7 x 10^5	+
50 C°, 3 hr	15.12a	39.14	2.1 x 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	-
CV (%)	15.23			

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

วิจารณ์

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพร์เมอร์ SCSMV-CPF /SCSMV-CPR ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 572 bp วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ความใกล้ชิดของสายวิวัฒนาการของเชื้อไวรัส SCSMV เปรียบเทียบกับข้อมูลของ KP987848.1 ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความคล้ายคลึงถึง 98 % สอดคล้องกับการศึกษาของ ปวีณาและคณะ (2554) ได้รายงานการตรวจพบเชื้อ SCSMV ในอ้อยจากหลายจังหวัดและเชื้อทั้งหมดมีความคล้ายคลึงกับเชื้อ SCMV-PAK ที่พบในอ้อยจากประเทศปากีสถาน ทั้งนี้การตรวจจับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณต่ำมาก ๆ ได้ เนื่องจากเทคนิค RT-PCR ที่มีความไวและความจำเพาะของ coat protein gene (ยีน CP) ที่ออกแบบมาให้มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัสชนิดนี้ทำให้การตรวจวินิจฉัยได้ง่ายขึ้น เนื่องจากปัจจุบันพบอาการใบขีดด่างค่อนข้างมากในแปลงปลูกอ้อยที่มีการใช้ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีการติดเชื้อและพบในระยะอ้อยตอเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดการละเลยยังไม่ได้ให้ความสำคัญกับอาการใบขีดด่าง ยังคงมีการขยายพันธุ์อ้อยที่มีอาการดังกล่าวไปปลูกในฤดูกาลถัดไปอีก ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้โรคใบขีดด่างยังคงระบาดอย่างแพร่หลายในประเทศไทยจนถึงปัจจุบัน การป้องกันกำจัดยังไม่มีพันธุ์อ้อยที่มีความต้านทานต่อโรคนี้ การจัดการท่อนพันธุ์ให้สะอาดจึงเป็นหนึ่งแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคใบขีดด่าง ผลจากการงานวิจัยนี้ พบว่าสามารถ กำจัดเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์อ้อยได้ที่อุณหภูมิ 50 C° นาน 5 ชั่วโมง ท่อนอ้อยที่ติดเชื้อไวรัสจะมีอัตราการงอกที่ต่ำกว่าท่อนอ้อยปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ สุนี และ

คณะ (2557) ได้ศึกษาการแช่น้ำร้อนสามารถลดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวได้แต่การใช้เวลานานทำให้ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยลดลง การกำจัดเชื้อจากท่อนพันธุ์ด้วยการแช่ท่อน พันธุ์ในน้ำร้อนในประเทศไต้หวันใช้ที่อุณหภูมิ 52 C° เป็นเวลา 8 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 54 C° เป็นเวลา 40 นาที แต่การใช้น้ำร้อนในระดับนี้ มีผลทำให้ท่อนพันธุ์อ้อยสูญเสียความสามารถในการงอกไปด้วย ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาการแช่น้ำร้อนมีผลต่ออัตราการงอกเพราะอุณภูมิที่สูงสามารถทำลายเนื้อเยื่อพืชให้เสียหายได้จึงต้องมีต้องมีการควบคุมระยะเวลาในการแช่ทุกครั้ง การศึกษาวิธีการกำจัดเชื้อไวรัสในท่อนพันธุ์อ้อยโดยการแช่น้ำร้อนเป็นการควบคุมการแพร่ระบาดและลดปริมาณของเชื้อที่จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผลผลิตได้

สรุป

การแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง สามารถกำจัดเชื้อไวรัสสาเหตุใบขีดด่างในท่อนพันธุ์อ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นแนวทางในการกำจัดและป้องการแพร่กระจายของโรคใบขีดด่างได้

เอกสารอ้างอิง

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

วีรกรณ์ แสงไสย์, เบญจวรรณ รัตวัตร, นัฐภัทร์ คำหล้า และศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล. 2564. การตรวจสอบเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* สาเหตุโรคใบขีดด่างของอ้อยในประเทศไทยด้วยเทคนิคอาร์ที-พีซีอาร์. แก่นเกษตร. 49(1): 844-849.

สุนี ศรีสิงห์, วัลลิภา สุชาโต และวาสนา ยอดปรางค์. 2557. ศึกษาปฏิกิริยาของอ้อยโคลนดีเด่นต่อโรคใบขีดด่างของอ้อย. รายงานผลงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร ผลงานวิจัยและพัฒนา ปี 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.

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

Xu, D. L., G. H. Zhou, Y. J. Xie, R. Mock, and R. Li. 2010. Complete nucleotide sequence and taxonomy of *Sugarcane streak mosaic virus,* member of a novel genus in the family Potyviridae. Virus Genes. 40: 432-439.

View publication stats