



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

เรื่อง โครงการ นวัตกรรม การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา
และการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี

โดย

รศ.สุภาพร กลิ่นคง และคณะ

กันยายน 2558



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

เรื่อง โครงการ นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาและ การควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รศ.สุภาพร กลิ่นคง	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผศ.ดร.สุจินต์ ภัทรภูวดล	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รศ.ดร.คณินนิตย์ เหมียวรรการ	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รศ.ดร.ชลิตา เล็กสมบูรณ์	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รศ.ดร.เรวัต เลิศฤทัยโยธิน	ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัญญาเลขที่ RDG5750035
โครงการ “นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาและการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี”
รายงานฉบับสมบูรณ์

ส่วนที่ 1. รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาและการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี

(ภาษาอังกฤษ) Innovative detection of phytoplasma and biocontrol for sugarcane white leaf disease

ชื่อผู้วิจัย นางสาวพร กลิ่นคง

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

หมายเลขโทรศัพท์/โทรสาร 034-351890/034-351890 E-mail agrsup@ku.ac.th

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

งบประมาณที่ได้รับ 1,430,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ เดือนสิงหาคม 2557 ถึง เดือนกรกฎาคม 2558

รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3 ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 กุมภาพันธ์ ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2558

ส่วนที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1.1 เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากอ้อย

2.2 Gantt Chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ช่วงระยะเวลาตามแผน	ช่วงระยะเวลาที่ทำจริง	ข้อชี้แจง
โครงการวิจัยที่ 1				
1. เพื่อให้ได้องค์ความรู้/ข้อมูลพื้นฐานของ <i>Imp</i> gene	1.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ <i>Imp</i> gene ด้วยเทคนิค PCR	ส.ค.57-ต.ค.57	ส.ค.57-ต.ค.57	

	1.2 สังเคราะห์และโคลน <i>Imp</i> gene	พ.ย.57-ม.ค.58	พ.ย.57-ม.ค.58	สังเคราะห์ <i>Imp</i> gene จากข้อมูล ยีนของเชื้อใน กลุ่มเดียวกับอ้อย ใบขาว คือ <i>Candidatus</i> <i>Phytoplasma</i> <i>oryzae</i>
	1.3 วิเคราะห์ข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ <i>Imp</i> gene	ก.พ.58-ก.ค.58	ก.พ.58-ก.ค.58	
2. เพื่อให้ได้ วิธีการตรวจเชื้อ ไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาว อ้อยด้วยเทคนิค LAMP โดยการ ตรวจยีน 16S rRNA และ <i>secA</i>	2.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่ สำหรับการตรวจยีน 16S rRNA และ <i>secA</i> สำหรับ เทคนิค LAMP	ส.ค.57-ต.ค.57	ส.ค.57-ต.ค.57	
	2.2 ทดสอบสภาวะที่ เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP	พ.ย.57-ม.ค.58	พ.ย.57-ม.ค.58	
	2.3 ทดสอบวิธีที่เหมาะสม ในการตรวจวัดยีนที่เพิ่ม ขยายขึ้นด้วยเทคนิค visual LAMP	ก.พ.58-ก.ค.58	ก.พ.58-ก.ค.58	
3. ถ่ายทอด เทคโนโลยีให้แก่ หน่วยงานภาครัฐ และเอกชนที่ เกี่ยวข้องกับ อุตสาหกรรม อ้อย	3.1 จัดฝึกอบรมวิธีการ ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย เทคนิค LAMP	มิ.ย.58-ก.ค.58	มิ.ย.58-ก.ค.58	
โครงการวิจัยที่ 2				
1. เพื่อแยก แบคทีเรียอ้อย ที่เป็นแบคทีเรีย ครอบครอง บริเวณรากและ ภายในอ้อย	1.1 เก็บดินและต้นอ้อย จากแหล่งปลูกอ้อย ภาคกลาง ภาคเหนือ และ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ส.ค.57-ก.ค.58	ส.ค.57-ก.ค.58	
	1.2 แยกแบคทีเรียจากดิน และต้นอ้อย	ส.ค.57-ก.ค.58	ส.ค.57-ก.ค.58	

2. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการส่งเสริมการเจริญของพืชในระดับห้องปฏิบัติการ	2.1 ทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียอ้อย ดังนี้ - การผลิต IAA (indole 3-acetic acid) - การละลายโพแทสเซียมและฟอสเฟต - การตรึงไนโตรเจน	ก.ย.57-ก.ค.58	ก.ย.57-ก.ค.58	
3. ประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียอ้อยในการผลิตสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับห้องปฏิบัติการ	3.1 คัดเลือกเชื้อที่จะใช้เป็นเชื้อทดสอบการผลิตสารปฏิชีวนะในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น tetracycline 3.2 ทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียอ้อยในการสร้างสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมา	ก.ย.57-ก.ค.58	ก.ย.57-ก.ค.58	

2.3 ตารางเปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และที่ได้จริง

Output		ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100% ให้ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ)
กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ	ผลสำเร็จ (%)	
1. ได้ชุดไพรเมอร์สำหรับยีน <i>Imp</i> gene	100%	-
2. สังเคราะห์ <i>Imp</i> gene และได้โคลน <i>Imp</i> gene	100%	
3. ได้ชุดไพรเมอร์สำหรับยีน 16S rRNA และ <i>secA</i> สำหรับเทคนิค LAMP	100%	-
4. ได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยใบขาว	100%	-
5. จัดฝึกอบรมวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP	100%	
6. ได้ตัวอย่างดินและต้นอ้อยจาก 11 จังหวัด รวมแล้วจำนวน 220 ตัวอย่าง	100	-
7. ได้แบคทีเรียจากดินและต้นอ้อย ไม่น้อยกว่า 660 ไอโซเลต	100	-
8. ทดสอบและรวบรวมแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของพืช	100	-

ไม่น้อยกว่า 15 ไอโซเลต		
9. ทดสอบและรวบรวมแบคทีเรียที่มี คุณสมบัติผลิตสารในกลุ่มที่มีฤทธิ์ ยับยั้งหรือทำลายเชื้อไฟโตพลาสมา ไม่น้อยกว่า 2 ไอโซเลต	100	-

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี) -

2.5 งบประมาณของโครงการที่ได้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น

1,280,500.00 บาท

หมวด	รายจ่ายงวด 1	รายจ่ายงวด 2	รวมรายจ่าย	งบประมาณตาม สัญญา
ก. ส่วนที่โครงการบริหาร				
1. ค่าตอบแทน	39,000.00	19,500	58,500.00	78,000.00
2. ค่าจ้าง	-	-	-	-
3. ค่าใช้สอย	317,767.06	380,524.45	698,291.51	718,400.00
4. ค่าวัสดุ	217,738.71	305,969.78	523,708.49	503,600.00
รวม	574,505.77	705,994.23	1,280,500.00	1,300,000.00

2.6 งานตามแผนโครงการวิจัยที่จะทำต่อไป -

2.7 ค่าชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา/อุปสรรค และวิธีการแก้ไข -

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว. -

(ลงนาม)

ผู้อำนวยการแผนวิจัย

.....
(รองศาสตราจารย์สุภาพร กลิ่นคง)

วันที่ 30 กันยายน 2558

นวัตกรรมการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาและการควบคุมโรคใบขาวอ้อยโดยชีววิธี

Innovative detection of phytoplasma and biocontrol for
sugarcane white leaf disease

สุภาพร กลิ่นคง และ ชลิตา เล็กสมบุญ

Supaporn Klinkong and Chalida Leksomboon

บทสรุปผู้บริหาร

โรคใบขาวของอ้อยสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมามีการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทย ในปัจจุบันมีรายงานการระบาดปีละไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านบาท โรคนี้แพร่ระบาด โดยเชื้อติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นที่เป็นโรค และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ ในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้ได้ผลแบบยั่งยืนในการระยะยาวและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปในปัจจุบันคือ การใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรค จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการพัฒนาการสร้างความต้านทานให้กับพืช โดยการใช้แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับพืชตามธรรมชาติ โดยแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยครอบครองอยู่บริเวณรากพืช หรือภายในต้นพืช และสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช ผลผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค กระตุ้นให้พืชผลิตสารที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยเพื่อรับรองท่อนพันธุ์ปลอดโรค และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากอ้อย

ผลการวิจัยการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อสามารถพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อให้สามารถตรวจหาเชื้อได้อย่างง่าย รวดเร็ว และมีราคาถูก โดยใช้ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ จำเพาะกับยีน 16S rRNA สามารถประยุกต์ใช้ในการประเมินโรคในแปลงเบื้องต้นและห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ ใช้เครื่องมือง่ายๆ เพียงเครื่อง Heat box และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยตาเปล่าด้วยการเติมสาร SYBR Green รวมทั้งออกแบบและทดสอบชุดไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนอื่นเช่น secA เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคนี้ นอกจากนี้การพัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยการสังเคราะห์ Imp gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus Phytoplasma oryzae* strain: RYD ได้โคลนของ Imp gene (RYD-IMP) ที่ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว และจะนำเข้าสู่ *E. coli* BL21 เพื่อชักนำการผลิต RYD-IMP protein ต่อไป

ผลการคัดเลือกและตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียที่อยู่ภายในต้นอ้อยและบริเวณรากอ้อยที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช เพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบขาวอ้อย โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญ 11 จังหวัด รวมทั้งหมด 220 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียภายในอ้อย จำนวน 401 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากอ้อย เป็นจำนวน 558 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการตรึงไนโตรเจน มีคุณสมบัติในการละลายฟอสเฟต และมีคุณสมบัติในการละลายโพแทสเซียม จำนวน 503, 480 และ 230 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลตที่แสดงผลเป็นบวกมาทดสอบพบว่า 43 ไอโซเลต สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะเตตราซัยคลิน ด้วยวิธี paper disc agar diffusion โดยใช้เชื้อที่ไวต่อสารเตตราซัยคลินเป็นเชื้อทดสอบแทนเชื้อ

ไฟโตพลาสมาซึ่งไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จากแบคทีเรียทั้งหมด 959 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 18 ไอโซเลท ที่แยกจากดินบริเวณรากพืช แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่ไวต่อสารเตตราซัยคลิน และไม่มีแบคทีเรียจากต้นที่แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ไปตรวจสอบการผลิตสารเตตราซัยคลินโดยวิธี high performance liquid chromatography พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่สามารถผลิตสารเตตราซัยคลิน จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทำการตรวจสอบการสร้างสาร surfactin ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* และเป็นชีวภัณฑ์ลดแรงตึงผิวที่สามารถยับยั้งเชื้อไฟโตพลาสมา จากการตรวจสอบ เบื้องต้นกับแบคทีเรียจำนวน 25 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค drop-collapse พบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสาร surfactin ทั้งนี้จะต้องนำไอโซเลทที่แสดงศักยภาพไปทดสอบต่อกับอ้อย เพื่อทราบประสิทธิภาพในการนำไปใช้ควบคุมโรคใบขาวของอ้อยต่อไป

บทนำ

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย มีพื้นที่ปลูกอยู่ในเขตภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีพื้นที่ปลูกมากที่สุดอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร พบว่าในปี 2555 มีเนื้อที่เก็บเกี่ยวทั่วประเทศประมาณ 8 ล้านไร่ ผลผลิตมากกว่า 95 ล้านตัน (<http://www.oae.go.th/>) ประเทศไทยมีการส่งออกน้ำตาลดิบคิดเป็นมูลค่า 20,000-30,000 ล้านบาทต่อปี ปัจจุบันการผลิตอ้อยนอกจากใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมน้ำตาล ยังมีการนำไปใช้ผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน การเพิ่มผลผลิตโดยไม่เพิ่มพื้นที่ปลูก ทำได้โดยการจัดการระบบการปลูกและการใช้พันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตสูง ปัญหาด้านโรคที่เกิดกับอ้อยเป็นปัญหาสำคัญในการผลิต เนื่องจากอ้อยมีโรคมากกว่า 30 โรค (ธนากร และคณะ, 2526) โรคหลายชนิดมีความสำคัญและทำให้สูญเสียผลผลิต ดังนั้น จะต้องเฝ้าระวังการระบาดของโรคประเภทนี้ โดยโรคใบขาวอ้อย เป็นโรคหนึ่งที่มีความสำคัญทำให้สูญเสียผลผลิต โรคใบขาวอ้อย ปรากฏขึ้นและกระจายไปในหลายพื้นที่ โดยเฉพาะในพื้นที่ปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

โรคใบขาวอ้อยมีการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทย มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา ปัจจุบัน ก่อให้เกิดความเสียหายเพิ่มขึ้น โดยในปี 2554 มีพื้นที่โรคระบาดกว่า 200,000 ไร่ ผลผลิตเสียหายกว่า 1,700 ล้านบาท ซึ่งมีการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรค และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ 2 ชนิด ได้แก่เพลี้ยจักจั่นปีกลาย (*Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว ชนิด *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura) แนวทางการควบคุมโรคใบขาวอ้อยที่แนะนำกันโดยทั่วไป ได้แก่ การใช้พันธุ์ท่อนพันธุ์สะอาดจากแหล่งที่ไม่มีการระบาด การใช้อ้อยปลอดเชื้อที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การ ควบคุมแมลงพาหะ การเปลี่ยนเวลาปลูกเพื่อเลี่ยงการติดเชื้อจากแมลงพาหะ การตัดวงจรการระบาดของโรคโดยปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค และแมลงพาหะ การทำลายกออ้อยเป็นโรค เป็นต้น วิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ให้ผลแบบยั่งยืน คือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานโรคใบขาว แต่ยังไม่มียารายงานถึงความสำเร็จ ฉะนั้นการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้ได้ผลเป็นที่ยอมรับในขณะนี้ คือการใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แม้ว่าวิธีนี้อ้อยอาจจะติดโรคในแปลงจากการ

ถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ และอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการแก้ปัญหาโรคใบขาว คือแนวความคิดในการสร้างความต้านทานให้กับพืช

การตรวจวินิจฉัยโรคเป็นเครื่องมือที่จำเป็นในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยที่กล่าวข้างต้น จึงเป็นที่มาของโครงการที่ 1 ที่จะมีการพัฒนาวิธีตรวจสอบเชื้อด้วยเทคโนโลยีใหม่ที่มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ รวดเร็ว มีความไวสูง และใช้งานได้สะดวก เพื่อให้มีความหลากหลายรองรับการตรวจสอบในทุกระดับ และเพื่อการตัดสินใจการบริหารจัดการโรคให้เหมาะสม ปัจจุบันมีหลายเทคนิคที่นิยมใช้ได้แก่ การตรวจดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิค Nested PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจยีน 16S rRNA , 16S-23S ITS และ 23S rRNA ของเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ เทคนิค PCR ที่ใช้เป็นพื้นฐานทั่วไป จะใช้เวลาในการตรวจสอบนานประมาณ 3-4 ชั่วโมงขึ้นไป ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะที่มีความแม่นยำสูงเช่น เครื่อง PCR เครื่อง real time PCR ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ไม่สามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กได้ ในปี ค.ศ. 2010 ได้มีรายงานการพัฒนาวิธีการเพิ่มขยายยีนเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ขึ้น ซึ่งได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR คือไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีนสามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส และตรวจสอบยีนที่เพิ่มจำนวนได้ในขั้นตอนเดียวกัน เทคนิคนี้จึงเหมาะกับห้องปฏิบัติการเล็กๆ ในภูมิภาคในการตรวจเชื้อในระดับแปลงขยายพันธุ์

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิคเซรัมวิทยา ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจโปรตีนของเชื้อโดยใช้แอนติบอดี โดยในระยะแรกการผลิตแอนติบอดีทั้งแบบโพลีโคลนอล และโมโนโคลนอล ที่ผลิตจากส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อที่สกัดจากพืชเป็นโรค ซึ่งมักพบปัญหาการปะปนของโปรตีนพืช เมื่อนำโปรตีนของเชื้อที่สกัดได้ไปฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง จะมี anti-plant antibodies ในแอนติเซรัมด้วยเสมอ ทำให้ปฏิกิริยาการตรวจเชื้อในพืชไม่ชัดเจน จึงมีการพัฒนาการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อไฟโตพลาสมาในหลอดทดลองด้วยกระบวนการ protein expression ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* เพื่อใช้เป็นแอนติเจนกระตุ้นสัตว์ทดลองเพื่อแก้ปัญหาการปะปนของโปรตีนพืช จากข้อมูลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมาบางชนิด พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมามีหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของเชื้อทั้งในพืชอาศัยและแมลงพาหะ โปรตีนที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์มีหลายชนิด เช่น Sec protein (SecA, SecE, SecY), Arginine transporter (ArtI) และ Immunodominant membrane proteins (Imps) โดยเฉพาะ Imps เป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากบนเยื่อหุ้มเซลล์ และอยู่ด้านนอกเซลล์ไฟโตพลาสมา และพบว่าแอนติบอดีต่อ Imps ของเชื้อหลายกลุ่ม โดยเฉพาะในกลุ่ม aster yellows และ rice yellow dwarf มีศักยภาพในการใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีเพราะมีปริมาณมากกว่าโปรตีนชนิดอื่นที่พบในเชื้อไฟโตพลาสมา คณะผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าการศึกษาค้นคว้าข้อมูล *Imp genes* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับ rice yellow dwarf การสังเคราะห์โปรตีน Imps โดยกระบวนการ protein expression และผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน Imps เพื่อใช้ตรวจเชื้อ จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาศักยภาพการตรวจเชื้อทั้งในอ้อยและแมลง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมโรคและการพัฒนาพันธุ์อ้อยต้านทานโรคในอนาคต และการพัฒนาเทคนิค LAMP เพื่อนำมาใช้กับห้องปฏิบัติการขนาดเล็กในระดับภูมิภาคเพื่อตรวจเชื้อในแปลงขยายพันธุ์ จะเป็นประโยชน์ในกระบวนการผลิตและรับรองพันธุ์อ้อยปลอดโรค

การป้องกันกำจัดโรคพืชที่ให้ผลดีและยั่งยืนวิธีหนึ่งคือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค แต่ในกรณีของโรคใบขาวอ้อย ยังไม่มีรายงานถึงพันธุ์อ้อยต้านทานโรคใบขาว จึงเป็นที่มาของโครงการที่ 2 คือการสร้าง

ต้านทานให้กับพืช ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุมและป้องกันโรค วิธีการสร้างความต้านทานให้กับพืชที่มีรายงานไว้นั้น มีหลายวิธี เช่น การใช้สารเคมีในการกระตุ้น การเพิ่มธาตุอาหารบางชนิดให้แก่พืช และอีกวิธีการหนึ่งที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ ได้แก่ การใช้แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับพืชตามธรรมชาติ โดยแบคทีเรียเหล่านี้อาศัยครอบครองอยู่บริเวณรากพืช หรือภายในต้นพืช และสามารถส่งเสริมการเจริญของพืช ผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค กระตุ้นให้พืชผลิตสารที่ยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค การใช้แบคทีเรียในการสร้างความต้านทานให้กับพืชเป็นวิธีการที่ยั่งยืน ตั้งแต่การเพาะปลูกจนเก็บเกี่ยว และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ควบคุมและป้องกันโรคใบขาวอ้อย โดยการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่แยกได้ในด้านการส่งเสริมการเจริญของพืช การควบคุมโรค และการสร้างความต้านทานให้กับอ้อย

คุณลักษณะของแบคทีเรียที่อยู่อาศัยกับพืช และเป็นประโยชน์ในระบบการผลิตพืชมีมากมาย เช่น การผลิตสารปฏิชีวนะ หรือสารที่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อโรค การผลิตสารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืช เช่น ออกซิน และ siderophore การเปลี่ยนรูปสารหรือธาตุอาหารให้พืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต แบคทีเรียที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการปลูกพืชและเป็นที่รู้จักกันดี ได้แก่ ไรโซเบียมซึ่งช่วยตรึงไนโตรเจนให้แก่พืชตระกูลถั่ว ข้อจำกัดของเชื้อแบคทีเรียพวก Rhizobia ได้แก่ ความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของพืชอาศัย เชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มที่เป็นประโยชน์และมีศักยภาพในการนำไปใช้ ได้แก่ แบคทีเรียที่ครอบครองบริเวณรากพืช (root colonizing bacteria) ซึ่งมีหลายประเภทที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่ แบคทีเรีย PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria) โดยแบคทีเรีย PGPR เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณเขตรากพืช พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถชักนำให้พืชต้านทานโรค หรือทำให้เกิด ISR (Induced systemic resistance) เนื่องจากแบคทีเรีย PGPR มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์หลายด้าน นักโรคพืชจึงทำการศึกษาวจัยเพื่อนำมาใช้ในการชักนำพืชให้ต้านทานโรค ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่า การจัดการโรคพืชที่ดีที่สุดคือการใช้พืชที่ต้านทานโรค ข้อดีของแบคทีเรีย PGPR คือ เป็นเชื้อที่ไม่มีความเฉพาะเจาะจงต่อพืชอาศัย และสามารถชักนำให้พืชต้านทานโรคได้อย่างกว้างขวาง ทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายชนิด เช่นโรคที่เกิดจากเชื้อรา (Wei และคณะ, 1991; Liu และคณะ, 1995a; Vidhyasekaran และ Muthamilan, 1999; Berg และคณะ, 2001; Pal และคณะ, 2001; Srivastava และคณะ, 2001; Viswanathan และ Samiyappan, 2002; Walker และคณะ, 2002; Zhang และคณะ, 2002) แบคทีเรีย (Alstrom, 1991; Liu และคณะ, 1995b; Wei และคณะ, 1996; Park และ Kloepper, 2000) ไวรัส (Maurhofer และคณะ, 1994; Raupach และคณะ, 1996; Murphy และคณะ, 2000) และไส้เดือนฝอย (Siddiqui และ Mahmood, 1999) การศึกษาทั่วโลกที่ PGPRs สามารถชักนำความต้านทานโรคในพืชต่างๆ โดยเฉพาะกับ PGPR พวก *Pseudomonas fluorescens* พบว่า เกิดจากการสะสมสาร phenolic compounds การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) และ PR-proteins

นอกจากนี้ ยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆที่ไม่ได้อยู่บริเวณเขตรากพืช ที่สามารถชักนำให้พืชต้านทานโรคและนำมาใช้ในการควบคุมโรค โดย Bashan และ Holguin (1998) เสนอให้ใช้คำว่า PGPB (plant growth promoting bacteria) และ biocontrol-PGPB (biocontrol plant growth-promoting bacteria) ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการศึกษากันมากกับพวกแบคทีเรียที่อยู่ภายในพืช (endophytic bacteria) การศึกษา endophytic bacteria โดย Hollis (1951) พบว่ามีแบคทีเรียที่อยู่ภายในพืชและไม่ได้ทำให้พืชเป็นโรค มีการศึกษา endophytic bacteria ในพืชชนิดต่างๆมากมาย ได้แก่ พืชไร่ต่างๆ

เช่น พืชอาหารสัตว์ clover (Philipson and Blair, 1957) และ alfalfa (Gagne และคณะ, 1987) พืชไร่อุตสาหกรรม เช่น sugar beet (Jacobs และคณะ, 1985), ฝ้าย (Misaghi และ Donndelinger, 1990) พืชผัก เช่น *Brassica* spp. (Agarwal และ Shende, 1987), มะเขือเทศ (van Peer และคณะ, 1990) และไม้ผล เช่น cherry trees (Cameron, 1970), ส้ม (Gardner และคณะ, 1982), pear trees (Whitesides และ Spotts, 1991), องุ่น (Bell และคณะ, 1995) การศึกษา endophytic bacteria ได้รับความสนใจมากขึ้นเมื่อพบว่า แบคทีเรียพวก endophytic bacteria สามารถส่งเสริมการเจริญของพืชและกระตุ้นกลไกความต้านทานในพืช (Hallmann, 2001)

การศึกษา PGPR ในอ้อยโดย Villegas (2001) ได้ทำการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อย และศึกษากลไกการส่งเสริมการเจริญของอ้อยโดยการติดตามเชื้อด้วยวิธีการติดฉลากด้วยยีน *gusA* พบว่า *Pseudomonas fluorescens* ไอโซเลท LV7 ซึ่งสามารถส่งเสริมให้ความสูง น้ำหนักมวลรวมของยอดและราก และความยาวรากเพิ่มขึ้น โดยเชื้อครอบครองอยู่บริเวณเนื้อเยื่อรากอ้อย Viswanathan และ Samiyappan (2002) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent pseudomonads จากบริเวณเขตรากอ้อย พบว่า PGPR ที่แยกได้และนำมาทดสอบสามารถชักนำให้อ้อยต้านทานโรคเน่าแดง โดยทำให้การเกิดโรคลดลง และเห็นผลชัดเจนในอ้อยพันธุ์อ่อนแอโรค

ในประเทศไทยได้มีการคัดเลือกไรโซแบคทีเรียจากอ้อยซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากดินบริเวณรากอ้อยและศึกษาการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวเน่าแดงของอ้อย (วรารณา และคณะ, 2549) และเมื่อทำการทดสอบในสภาพแปลงทดลอง พบว่า ไรโซแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ E7-17 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินบริเวณรากอ้อย สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยได้ดี (ชลิตา และ นัฐพร, 2550) และแสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวเน่าแดง โดยเมื่อทำการแช่ท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้ออย่างรุนแรงในเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียสายพันธุ์ E7-17 พบว่า สามารถควบคุมโรคได้ดี (อัจฉราวรรณ และคณะ, 2553)

มีการศึกษาแบคทีเรียที่อยู่อาศัยกับพืชกับโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมา มีรายงานในองุ่น โดยพบว่า endophytic bacteria ลดการเกิดโรคเหลือง (grapevine yellows) ขององุ่น และทำให้องุ่นมีอายุการดีขึ้น (Bulgari *et al.*, 2010)

สรุปผลการดำเนินงาน

โครงการวิจัยที่ 1

พัฒนา Imp antibody เพื่อใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ทำการสังเคราะห์ *Imp* gene จากข้อมูลยีนของ *Candidatus* Phytoplasma oryzae strain: RYD ได้โคลนของ *Imp* gene (RYD-IMP) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 501 bp ซึ่งแปลรหัสของกรดอะมิโนได้ 164 aa ขึ้นยีนสังเคราะห์ RYD-IMP ได้ถูก clone เข้า pJET และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันความถูกต้อง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน RYD-IMP ที่สังเคราะห์พบว่ามีค่าความเหมือนกัน 100% เตรียม expression plasmid vector pET200 ที่เปิดด้วย *NheI* และ *SacI* เพื่อนำชิ้น pJET-RYD-IMP จาก pJET เข้าเชื่อมต่อ และตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง ก่อนนำเข้าสู่ *E. coli* BL21 เพื่อชักนำการผลิต RYD-IMP protein ต่อไป

การ เพิ่มปริมาณยีน *Imp* gene จากตัวอย่างอ้อยใบขาวด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Rnc-1/PssA-1 พบว่ายังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากอ้อยใบขาว และอยู่ระหว่างดำเนินการทดสอบไพรเมอร์คู่อื่นและสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณยีน *Imp* จากตัวอย่างอ้อยใบขาวเพิ่มเติม

พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP

การตรวจยีน 16S rRNA ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1247 bp ได้ชุดไพรเมอร์ ดังนี้

ชุดที่ 1 คือไพรเมอร์ R16-SCBR (BIP-16S rDNA-SCBR-ST, FIP-16S rDNA-SCBR-ST, B3-16S rDNA-SCBR-ST และ F3-16S rDNA-SCBR-ST) ออกแบบจากไอโซเลทบุรีรัมย์

ชุดที่ 2 คือไพรเมอร์ R16-SCLP (BIP-16S rDNA-SCLP-HCh, FIP-16S rDNA-SCLP-HCh, B3-16S rDNA-SCLP-HCh และ F3-16S rDNA-SCLP-HCh) ออกแบบจากไอโซเลทลำปาง

ทดสอบได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยการปรับความเข้มข้นขององค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา และความเข้มข้นของไพรเมอร์ให้เหมาะสม ผลการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองชุดและองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยามีความเหมาะสมในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ทั้งการตรวจด้วยเครื่อง Thermocycler และ Heat box สามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยการเรืองแสงเมื่อเติมสาร SYBR Green และยืนยันการตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอหลายขนาดมีลักษณะคล้ายขั้นบันได และผลการตรวจสอบสอดคล้องกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค Nested PCR

การตรวจยีน *secA* เพิ่มปริมาณยีน *secA* โคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำข้อมูลมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ได้โคลนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,230 และ 1,237 bp ของเชื้อไฟโตพลาสมา 2 ไอโซเลท ได้แก่ SCWL_KB-*secA* จากจ.กาญจนบุรี และ SCWL_NP-*secA* จากจ.นครปฐม ตามลำดับ ออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน *secA* ได้ชุดไพรเมอร์ *secA*-SCWL-KB (FIP-*secA*-SCWL-KB, BIP-*secA*-SCWL-KB, F3-*secA*-SCWL-KB, B3-*secA*-SCWL-KB) และอยู่ระหว่างการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP สำหรับตรวจยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเช่นเดียวกับการทดสอบยีน 16S rRNA

โครงการวิจัยที่ 2

การคัดเลือก และตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียบริเวณรากที่สามารถส่งเสริมการเจริญของพืช และแบคทีเรียภายในพืชเพื่อใช้ในการควบคุมโรคใบขาวอ้อย โดยทำการแยกแบคทีเรียได้จำนวน 558 และ 401 จากดินบริเวณราก และจากต้นอ้อยใน 11 จังหวัด ได้แก่ ลพบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี นครสวรรค์ กำแพงเพชร นครราชสีมา อุดรธานี ขอนแก่น และชัยภูมิ นำแบคทีเรียทุกไอโซเลททดสอบความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะเตตราไซคลิน และการส่งเสริมการเจริญของพืชจากแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 959 ไอโซเลท พบว่า 503 ไอโซเลท สามารถเจริญบนอาหารที่ไม่มีไนโตรเจนได้ แบคทีเรียจำนวน 480 และ 230 ไอโซเลท สามารถละลายฟอสเฟต และโพแทสเซียม เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลทที่แสดงผลเป็นบวกมาทดสอบพบว่า 43 ไอโซเลท สามารถผลิตฮอร์โมนพืช IAA ใน

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะใช้วิธี paper disc agar diffusion พบว่ามีเพียง 18 ไอโซเลตที่แยกจากดินบริเวณรากพืช แสดงการเป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อทดสอบสายพันธุ์ที่ไวต่อสาร เตตราซัยคลิน และไม่มีแบคทีเรียจากต้นที่แสดงการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อนำแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ไปตรวจสอบการผลิตสาร เตตราซัยคลินโดยวิธี high performance liquid chromatography พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต ไม่สามารถผลิตสารเตตราซัยคลิน จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทำการตรวจสอบการสร้างสาร surfactin ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นชีวภัณฑ์ลดแรงตึงผิวที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อไฟโตพลาสมา จากการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค drop-collapse พบว่ามีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตสาร surfactin อย่างไรก็ตาม จะต้องนำไอโซเลตที่แสดงศักยภาพไปทดสอบต่อกับพืชเพื่อทราบประสิทธิภาพในการนำไปใช้ควบคุมโรคใบขาวอ้อย