



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีต แนวใหม่ในสภาพโรงเรือนอนุบาลและแปลงปลูก”

โดย

ดร.อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช	ภาควิชาโรคพืช
ดร.ประกาย ราชณวงษ์	ภาควิชากีฏวิทยา
ผศ.ดร.ศุภกิตต์ สายสุนทร	ภาควิชาเกษตรกลวิธาน
ดร.ศิริพร ดอนเหนือ	ภาควิชาโรคพืช
ดร.รุ่งโรจน์ พิทักษ์ดำนธรรม	ภาควิชาปฐพีวิทยา
อ.เจตษฎา อุตรพันธ์	ภาควิชาพืชไร่นา
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	

31 พฤษภาคม 2561

สัญญาเลขที่ RDG5950045

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ในสภาพ
โรงเรือนอนุบาลและแปลงปลูก”

โดย

ดร.อุดมศักดิ์ เลิศสุชาตวนิช	ภาควิชาโรคพืช
ดร.ประกาย ราชณวงษ์	ภาควิชากีฏวิทยา
ผศ.ดร.ศุภกิตต์ สายสุนทร	ภาควิชาเกษตรกลวิธาน
ดร.ศิริพร ดอนเหนือ	ภาควิชาโรคพืช
ดร.รุ่งโรจน์ พิทักษ์ด้านธรรม	ภาควิชาปฐพีวิทยา
อ.เจตษฎา อุตระพันธ์	ภาควิชาพืชไร่
คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	

31 พฤษภาคม 2561

บทสรุปผู้บริหาร

การผลิตอ้อยให้ได้ผลผลิต (yield) สูงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพมีปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวข้องกับหลายประการทั้งปัจจัยที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (biotic factor) และจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic factor) โดยปัจจัยดังกล่าวทั้งสองจะมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (interactions) ทั้งในด้านบวก (positive impact) และด้านลบ (negative impact) ได้มีผลกระทบเชิงบวกจะทำให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรงมีสุขภาพดี ให้ผลผลิตสูงทั้งปริมาณและคุณภาพ ในทางตรงกันข้ามหากเกิดผลกระทบเชิงลบจะทำให้การเจริญเติบโตไม่ดี สุขภาพอ่อนแอ และผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ

เนื่องจากการผลิตอ้อยที่ผ่านมาของเกษตรกรไทยไม่ได้ให้ความสำคัญด้านคุณภาพหรือสุขภาพของท่อนพันธุ์อ้อยที่นำมาปลูก ซึ่งจะใช้ท่อนพันธุ์เท่าที่จะหาได้หรือที่ให้ผลผลิตสูงโดยไม่คำนึงถึงโรคติดต่อที่มากับท่อนพันธุ์ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีโรคต่างๆระบาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบขาว (sugarcane white leaf, SCWL) ระบาดอย่างรุนแรงในพื้นที่ปลูกอ้อย อ้อยส่วนมากอ่อนแอต่อโรคนี้ทำให้มีผลผลิตต่ำและไม่สามารถไว้ต่ออ้อยได้หลายปี ส่งผลให้การผลิตอ้อยของประเทศไทยมีต้นทุนที่สูงและผลผลิตต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศผู้ผลิตอ้อยของโลก

งานวิจัยนี้ได้สะท้อนปัญหาความสำคัญของโรคใบขาวในเชิงเศรษฐกิจจากการสำรวจความรุนแรงของโรคใบขาวซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าความหวาน (Commercial Cane Sugar, CCS) โดยอ้อยที่เป็นโรคใบขาวระดับรุนแรงปานกลาง (3) จะมีค่า CCS ลดลงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับอ้อยที่มีอาการโรคใบขาวไม่รุนแรง (2) ซึ่งจะส่งผลต่อรายได้ของเกษตรกรอย่างมาก และงานวิจัยนี้ยังทางการแก้ไขโรคใบขาวของอ้อยโดยวิธีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคในโรงเรือนอนุบาลและแปลงปลูกทดลอง โดยการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยเทคนิค hot tetracycline treatment ความเข้มข้นสาร 500 ppm ที่อุณหภูมิ 54 C° นาน 30 นาที ซึ่งในงานวิจัยพบว่าสามารถช่วยลดการระบาดของโรคใบขาวในเบื้องต้นจากขั้นตอนที่เกษตรกรต้องมีการคัดเลือกท่อนพันธุ์ก่อนและทำการฆ่าเชื้อด้วยเทคนิค hot tetracycline treatment หลังจากนั้นข้อตาจะถูกนำไปเพาะภายในโรงเรือนป้องกันแมลงพาหะโรคใบขาว เมื่อข้อตาเจริญเป็นต้นกล้าอ้อยอายุ 1 เดือน นำลงแปลงปลูกทดสอบที่มีการทดลองเปรียบเทียบปัจจัยของการฆ่าเชื้อในท่อนพันธุ์ การใช้สารเคมีควบคุมแมลงพาหะ และการใส่ปุ๋ยที่เหมาะสมกับพื้นที่ ผลการทดลองพบว่าข้อตาอ้อยที่ผ่านการทำ hot tetracycline treatment จะงอกและเจริญเป็นต้นกล้าได้ดีกว่าชุดควบคุม ในการทดลองพบว่าอ้อยในทุกกรรมวิธีการทดลองมีการเจริญเติบโตและผลผลิตที่ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญจากชุดควบคุม รวมถึงการเกิดโรคใบขาวที่ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในทุกกรรมวิธีเมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน ซึ่งจะต้องมีการติดตามโรคใบขาวอ้อยในระยะอ้อยต่อไป เนื่องจากโรคใบขาวเป็นโรคที่จะแสดงออกอย่างชัดเจนในระยะอ้อยโต นอกจากนี้ทางโครงการยังได้จัดการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยการทำ hot tetracycline treatment พบว่าเกษตรกรให้ความสนใจเป็นอย่างมาก โดยในการอบรมเกษตรกรได้ร่วมปฏิบัติด้วยตนเองทุกขั้นตอนและสามารถผลิตพันธุ์อ้อยที่สะอาดไว้ใช้เป็นแม่พันธุ์

บทคัดย่อ

โรคใบขาวเป็นโรคที่สำคัญที่สุดของอ้อยที่ส่งผลเสียหายต่อผลผลิตของอ้อยที่เพาะปลูกในประเทศไทยอย่างมาก การระบาดของโรคใบขาวจะถ่ายทอดและติดไปกับท่อนพันธุ์เป็นหลัก โครงการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ในสภาพโรงเรือนอนุบาลและแปลงปลูกเป็นโครงการที่มีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาระบบการผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตอ้อยที่ดีทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ จากการวิจัยของโครงการนี้ทำให้ทราบผลกระทบของโรคใบขาวในเชิงคุณภาพโดยความรุนแรงของโรคใบขาวที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ค่าความหวาน (Commercial Cane Sugar, CCS) ของอ้อยลดลงอย่างมาก โดยอ้อยที่เป็นโรคใบขาวระดับรุนแรงปานกลาง (3) จะมีค่า CCS ลดลงมากกว่า 50% เมื่อเทียบกับอ้อยที่มีอาการโรคใบขาวไม่รุนแรง (2) ในงานวิจัยได้พัฒนาการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค conventional PCR และ real-time PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *SecA* gene ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาได้ต่ำสุดเท่ากับ 4.47×10^{-6} pg และ 4.47×10^{-8} pg ตามลำดับ การทดลองระบบการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ได้ทำในพื้นที่ อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อยรุนแรง ทางโครงการได้ทำการสร้างโรงเรือนป้องกันแมลงขนาด $5.5 \times 40 \times 2.8$ เมตร (กว้าง×ยาว×สูง) จำนวน 2 โรงเรือน สำหรับผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวและใช้สำหรับการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรผู้ปลูกอ้อย นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยสำหรับใช้ในการทดลองการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยเทคนิค hot tetracycline HCl treatment โดยเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยมีประสิทธิภาพในการแช่ข้อตาอ้อยได้ครั้งละ 1,000 ข้อตา ในการทดลองการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยเทคนิค hot tetracycline HCl treatment พบว่าอ้อยที่ผ่านการแช่จะงอกได้รวดเร็วและอัตราความงอกดีกว่าอ้อยที่ไม่ผ่านการแช่ ต้นกล้าอ้อยที่ผ่านการแช่ hot tetracycline HCl treatment เมื่อตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าไม่พบเชื้อสาเหตุโรคใบขาว จนกระทั่งนำต้นกล้าลงปลูกในแปลงอายุ 8 เดือน จึงตรวจพบเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในทุกกรรมวิธีการทดลอง

Abstract

Sugarcane white leaf disease (SCWL) is the most important disease of sugarcane in Thailand which caused dramatically reduce production of sugarcane. SCWL disease transmitted through vegetative propagation by cane stalk. An objective of this project to develop technique for produce sugarcane white leaf disease-free cuttings. This research showed that sugarcane white leaf (SCWL) disease severity affected to commercial cane sugar (CCS) values. At moderately virulent symptom (rating scale 3) CCS values was reduced more than 50% when compared with mildly virulent symptom (rating scale 2) of sugarcane white leaf disease. Detection of SCWL with conventional PCR and real-time PCR techniques were developed specific at *SecA* gene of sugarcane white leaf phytoplasma and the lowest sensitivity detected at 4.47×10^{-6} pg and 4.47×10^{-8} pg, respectively. Sugarcane white leaf disease-free cutting production experiment was conducted at Kosumpisai District, Mahasarakham Province, which have serious epidemic of SCWL disease. Two nurseries size $5.5 \times 40 \times 2.8$ m were built for sugarcane white leaf disease-free seedling production and training of sugarcane's grower. Sugarcane were treated with tetracycline HCl 500 ppm, 54°C for 30 min for control SCWL disease with developed water bath that have 1,000 single bud capacity. Results of sugarcane cutting after treated with hot tetracycline can germinate faster and grow more over than control treatment. SCWL phytoplasma cannot be detected in hot tetracycline treated sugarcane seedling until 8 months.

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	i
บทคัดย่อ (ไทย-อังกฤษ)	ii-iii
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ค-ง
สารบัญภาพ	จ-ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3-9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 การศึกษาผลกระทบของโรคใบขาวที่ความรุนแรงต่างๆ ต่อความหวานอ้อยและรายได้	10
3.2 การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย	10
3.3 การพัฒนาเครื่องแช่ข้อตาอ้อย	13
3.4 การศึกษาการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP)	19
3.5 การอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยยาปฏิชีวนะร้อน	23
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	
4.1 การศึกษาผลกระทบของโรคใบขาวที่ความรุนแรงต่างๆ ต่อความหวานอ้อยและรายได้	24
4.2 การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย	28
4.3 การพัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อย	34
4.4 การศึกษาการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP)	43
4.5 การอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดย ยาปฏิชีวนะร้อน	66
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	

บรรณานุกรม

ภาคผนวก ก แบบแปลนโรงเรือนทดลอง

ภาคผนวก ข เอกสารประกอบการอบรม

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 การแบ่งระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยและลักษณะอาการ	25
ตารางที่ 2 อ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 อายุ 15 เดือน บ.โนนทัน ต.วังยาว อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	25
ตารางที่ 3 อ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 อายุ 15 เดือน บ.หนองไร่ ต.วังยาว อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	25
ตารางที่ 4 อ้อยพันธุ์ K92-80 อายุ 14 เดือน บ.ทิพโส ต.ดอนกลาง อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	25
ตารางที่ 5 อ้อยพันธุ์ K92-80 อายุ 14 เดือน บ.หนองไร่ ต.วังยาว อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	26
ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของค่าความหวาน (%Brix) กับระดับความรุนแรงของโรคใบขาวในอ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 และ K92-80	26
ตารางที่ 7 ค่าความหวานอ้อย (%Brix และ commercial cane sugar, %CCS) กับระดับ ความรุนแรงของโรคใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ K92-80	26
ตารางที่ 8 การประเมินผลกระทบของระดับความรุนแรงโรคใบขาวอ้อยต่อรายได้ที่จะได้รับจาก การขายอ้อยของเกษตรกร	27
ตารางที่ 9 ผลของ nucleotide blast ของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย ตัวอย่าง S4 ที่เป็น recombinant clone (PG-S4 clone) เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในฐานข้อมูล Genbank, NCBI	32
ตารางที่ 10 ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot water treatment	43
ตารางที่ 11 ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot tetracycline treatment	44
ตารางที่ 12 ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot tetracycline treatment	44
ตารางที่ 13 อัตราความงอกของข้อตาอ้อยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 8 วัน ภายหลังการเพาะ	46
ตารางที่ 14 อัตราความงอกของข้อตาอ้อยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 17 วัน ภายหลังการเพาะ	46
ตารางที่ 15 อัตราความงอกของข้อตาอ้อยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 30 วัน ภายหลังการเพาะ	47
ตารางที่ 16 อัตราความงอกของข้อตาอ้อยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 30 วัน ภายหลังการเพาะ	47
ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบ NIP ที่อายุ 8 เดือน	57
ตารางที่ 18 การเจริญเติบโตของอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบ NIP ที่อายุ 10 เดือน	57
ตารางที่ 19 ผลผลิตของอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบ NIP ที่อายุ 12 เดือน	58
ตารางที่ 20 ความสูงลำต้น, จำนวนลำตอก และค่าบrix ที่อายุ 8 และ 9 เดือน, น้ำหนักต่อลำ, จำนวนลำต่อไร่, ค่าซีซีเอส, และผลผลิต (ตัน/ไร่) ของ 8 กรรมวิธีทดลองที่ปลูกในแปลง เกษตรกร อ. โกสุมพิสัย จ. มหาสารคาม ปี 2560	58

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 21 ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากกล้าอ้อยที่เริ่มปลูก ในแปลงทดลองระบบ NIP	59
ตารางที่ 22 ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากอ้อยอายุ 4 เดือน ในแปลงทดลองระบบ NIP	59
ตารางที่ 23 ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากอ้อยอายุ 6 เดือน ในแปลงทดลองระบบ NIP	60
ตารางที่ 24 ชนิดและจำนวนแมลงที่พบในแปลงอ้อยทดลองจากการใช้กับดักแสงไฟ ในช่วงเดือน มิถุนายน-สิงหาคม 2560 (ที่อ้อยอายุ 7-9 เดือน)	61-62
ตารางที่ 25 ชนิดและจำนวนแมลงที่ติดในกับดักกาวเหนียวสีน้ำเงิน เก็บข้อมูลครั้งที่ 1 มิถุนายน 2560 (อ้อยอายุ 7 เดือน)	63
ตารางที่ 26 ชนิดและจำนวนแมลงที่ติดในกับดักกาวเหนียวสีน้ำเงิน เก็บข้อมูลครั้งที่ 2 กรกฎาคม 2560 (อ้อยอายุ 8 เดือน)	64
ตารางที่ 27 จำนวนแมลงในวงศ์ Cicadellidae	65

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แผนผังเปรียบเทียบการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยระหว่างวิธีการของเกษตรกร (Farmer's Production, FP) กับวิธีการผลิตแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Production, NIP) โดยยึดแนวคิด “เพิ่ม จาก ลด” (More with Less)	4
ภาพที่ 2 อาการใบขาวในอ้อยที่ปลูกจากท่อนพันธุ์เป็นโรค อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น ในปี พ.ศ.2520 โดยกองที่ชุดขึ้นมาจาก ผศ.ดร.เกษม สุขสถาน (ที่มา: นิพนธ์ ทวีชัย, 2553)	5
ภาพที่ 3 การระบาดของโรคใบขาวในอ้อยต่อสามารถแพร่ระบาดได้อย่างกว้างขวาง	5
ภาพที่ 4 แมลงพาหะของโรคใบขาวได้แก่เพลี้ยจักจั่นปีกลาย (<i>Matsumuratettix hiroglyphicus</i>) (ก) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (<i>Yamatotettix flavovittatus</i>) (ข)	6
ภาพที่ 5 แผนผังการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยจากท่อนพันธุ์	6
ภาพที่ 6 ภาพอาการโรคใบต่าง	6
ภาพที่ 7 อาการของโรคราสนิม (ก) และอาการของโรคเขม่าดำ (ข)	7
ภาพที่ 8 แบบอุปกรณ์แช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบข้อตา	14
ภาพที่ 9 แผนผังการทดสอบ	15
ภาพที่ 10 ตำแหน่งการวางเทอร์โมคัปเปิ้ลในการทดสอบ	16
ภาพที่ 11 ระยะเวลาติดตั้งเทอร์โมคัปเปิ้ลเพื่อวัดอุณหภูมิ	17
ภาพที่ 12 การวางสายเทอร์โมคัปเปิ้ลไว้ที่ปลายฮีตเตอร์	17
ภาพที่ 13 แผนผังการทดสอบใช้น้ำหมุนเวียนระหว่างถังต้มและถังแช่ท่อนพันธุ์	18
ภาพที่ 14 การเก็บข้อมูลอุณหภูมิในถังแช่	18
ภาพที่ 15 การเก็บข้อมูลอุณหภูมิถังแช่แบบมีข้อตาอ้อย	19
ภาพที่ 16 ลักษณะของส่วนตาต่างๆ ในท่อนพันธุ์	20
ภาพที่ 17 กับดักกาเหวน้ำเงิน (blue sticky trap) และ กับดักแสงไฟ (light trap)	22
ภาพที่ 18 ภาพการสำรวจโรคใบขาวในแปลงปลูกเกษตรกรใน อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม	24
ภาพที่ 19 ภาพระดับความรุนแรงของโรคใบขาวของอ้อยจากการสำรวจ	24
ภาพที่ 20 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ secAfor/secArev; M = DNA ladder (Gene Ruler 100 bp plus), S4 = positive control, H20 = negative control, T11 = ตัวอย่างอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดโรคใบขาว (negative control), S7 = ตัวอย่างอ้อยที่นำมาเพาะไว้ในโรงเรือน, M4, M5, M7 และ M8 = ตัวอย่างอ้อยขอนแก่น 3	28
ภาพที่ 21 แสดงลักษณะ Melting curve จากปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ secAfor/secArev ในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย พบเพียงตัวอย่าง S4 ที่แสดงผลเป็นบวก (positive)	29

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 22 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Real-time PCR เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis; M = DNA ladder (Gene Ruler 100 bp plus), S4 = positive control, dH ₂ O = negative control, TS1-TS8 = อ้อยที่ผ่านกำจัดเชื้อด้วยวิธี hot tetracycline treatment, M4.3, M5.3, M7.3 และ M8.2 = อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3	29
ภาพที่ 23 ก. ภาพโครงสร้างของพลาสมิด pGEM®- T Easy Vector (Promega, USA) ข. Purified PCR product ตัวอย่าง S4 ขนาด 275 bp ที่จะนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์	30
ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>secAfor/secArev</i> ; lane1 = 100 bp DNA ladder, lane2 = ตัวอย่าง PG-S4 (<i>E. coli SecA recombinant clone</i>)	30
ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>secAfor/secArev</i>	31
ภาพที่ 26 Melting curve จากปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>secA</i> (ซ้าย) และค่า Ct value ของปฏิกิริยา (ขวา)	32
ภาพที่ 27 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาของเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ <i>secAfor/secArev</i> : M = DNA Ladder 100 bp, 1-13 = พลาสมิดเจือจาง 10^{-1} – 10^{-12} ตามลำดับ, 14 = H ₂ O (Negative control), 15 = อ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Negative control)	33
ภาพที่ 28 เครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 1 (ถังคู่)	34
ภาพที่ 29.1 ค่าของอุณหภูมิระดับกึ่งกลางถัง	35
ภาพที่ 29.2 ค่าของอุณหภูมิมินถัง	35
ภาพที่ 29.3 ค่าของอุณหภูมิช่วงปลายฮีตเตอร์	36
ภาพที่ 29.4 ค่าของอุณหภูมิกกลางฮีตเตอร์	36
ภาพที่ 30.1 การตั้งอุณหภูมิที่ 45.5 C° นาน 30 นาที แล้วเปิดระบบหมุนเวียนน้ำ (แบบไม่ใส่อ้อย)	37
ภาพที่ 30.2 การตั้งอุณหภูมิที่ 45.5 C° นาน 30 นาที แล้วเปิดระบบหมุนเวียนน้ำ (แบบใส่อ้อย)	37
ภาพที่ 30.3 การตั้งอุณหภูมิที่ 45.5 C° ใส่อ้อยในถัง และเปิดหมุนเวียนน้ำตั้งแต่เริ่มต้น	38
ภาพที่ 31 เครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 2 (ถังเดี่ยว)	39
ภาพที่ 32 ระบบหมุนเวียนน้ำในถังแช่	39
ภาพที่ 33.1 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 54 C°	40
ภาพที่ 33.2 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 49 C°	40
ภาพที่ 33.3 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 49 C° และใส่อ้อย	41
ภาพที่ 33.4 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 47 C° และไม่เปิดระบบปั้มน้ำ	41

ภาพที่ 33.5 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 47 °C และเปิดระบบปั๊มน้ำ	42
ภาพที่ 34 การงอกและการเจริญเติบโตของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot tetracycline treatment แบบต่างๆ ที่อายุ 1 เดือนหลังปลูก	45
ภาพที่ 35 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อยในต้นกล้าด้วยเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SecAfor/SecArev	48
ภาพที่ 36 โรงเรือนป้องกันแมลงเพื่อใช้ในการผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว	49
ภาพที่ 37 ขั้นตอนการผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคในโรงเรือนป้องกันแมลง	50
ภาพที่ 38 การเตรียมแปลงทดลองปลูกกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ในแปลงปลูกทดลอง	51
ภาพที่ 39 แปลงทดลองที่ 1 บ้านหนองกุงน้อย ต.แก้งแก อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม (10-12 มิถุนายน 2559)	51
ภาพที่ 40 แปลงทดลองที่ 2 บ้านแหใต้ ต.แหใต้ อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม (10-12 มิถุนายน 2559)	51
ภาพที่ 41 สภาพแปลงปลูก (ณ วันที่ 28 กรกฎาคม 2559) ถูกน้ำท่วมขังจนต้นกล้าตาย ทั้ง 2 แปลงทดลอง	51
ภาพที่ 42 การผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวครั้งที่ 2 (วันที่ 2 ตุลาคม 2559)	52
ภาพที่ 43 ต้นกล้าอ้อยอายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการทำ tetracycline treatment ความเข้มข้น 500ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที และชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่	53
ภาพที่ 44 การเตรียมแปลงทดลองปลูกกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ในแปลงปลูกทดลอง ณ บ้านหนองกุงเต่า ต.ท่าสองคอน อ.เมือง จ.มหาสารคาม	53
ภาพที่ 45 แผงผังแปลงทดลองการปลูกกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบ NIP	54
ภาพที่ 46 การเจริญเติบโตของกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวในแปลงปลูกทดลอง	55-56

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

การผลิตอ้อยให้ได้ผลผลิต (yield) สูงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพมีปัจจัยที่สำคัญเกี่ยวข้องหลายประการทั้งปัจจัยที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (biotic factor) และจากสิ่งไม่มีชีวิต (abiotic factor) โดยปัจจัยดังกล่าวทั้งสองจะมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน (interactions) ทั้งในด้านบวก (positive impact) และด้านลบ (negative impact) ได้มีผลกระทบเชิงบวกจะทำให้พืชเจริญเติบโตแข็งแรงมีสุขภาพดี ให้ผลผลิตสูงทั้งปริมาณและคุณภาพ ในทางตรงกันข้ามหากเกิดผลกระทบเชิงลบจะทำให้การเจริญเติบโตไม่ดี สุขภาพอ่อนแอ และผลผลิตลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ

เนื่องจากการผลิตอ้อยที่ผ่านมาของเกษตรกรไทยไม่ได้ให้ความสำคัญด้านคุณภาพหรือสุขภาพของท่อนพันธุ์อ้อยที่นำมาปลูก ซึ่งจะใช้ท่อนพันธุ์เก่าที่จะหาได้หรือที่ให้ผลผลิตสูงโดยไม่คำนึงถึงโรคติดต่อที่มากับท่อนพันธุ์ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีโรคต่างๆระบาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบขาวระบาดอย่างรุนแรงในพื้นที่ปลูกอ้อย อ้อยส่วนมากอ่อนแอต่อโรคนี้ทำให้มีผลผลิตต่ำและไม่สามารถไว้ต่ออ้อยได้หลายปี ส่งผลให้การผลิตอ้อยของประเทศไทยมีต้นทุนที่สูงและผลผลิตต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศผู้ผลิตอ้อยของโลก

แนวทางการวิจัยนี้อาศัยกรอบแนวคิดจากหลักการ “เพิ่มจากลด” (more with less) ของระบบ Sustainable Sugarcane Initiative (SSI) (ICRISAT-WWF Project, 2009) เป็นพื้นฐานเพื่อพัฒนาการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Production, NIP) ให้เหมาะสมกับการปลูกอ้อยของไทยโดยยึดหลัก “เพิ่มจากลด” กล่าวคือ การผลิตแบบประณีตจะเพิ่มในสิ่งที่เป็นประโยชน์และลดในสิ่งที่ไม่เป็นประโยชน์ เพื่อให้ได้ผลตอบแทนสูงสุดทั้งปริมาณและคุณภาพ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 1 ซึ่งจะช่วยการผลิตอ้อยของเกษตรกรไทยได้กำไรเพิ่มจากผลผลิตอ้อยที่มีคุณภาพดีและปริมาณสูง จากการลดการเกิดโรค ลดจำนวนท่อนพันธุ์ปลูก ลดค่าใช้จ่ายในการลงทุนกำจัดศัตรูพืช เพิ่มระยะเวลาในการไว้ต่อได้นานขึ้น เพิ่มกำไรในการปลูกอ้อยต่อครั้ง และสุดท้ายจะเป็นการเพิ่มความยั่งยืนในการปลูกอ้อยของเกษตรกร ในประเทศไทยนิพนธ์ (2523, 2524) ได้เสนอแนวทางการแก้ไขโรคใบขาวของอ้อยโดยวิธีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคในโรงเรือนอนุบาลด้วยระบบการจัดการคล้ายกับ SSI โดยเขียนบทความไว้ในวารสารนักวิชาการอ้อยและน้ำตาล แต่ข้อเสนอดังกล่าวยังไม่ได้รับการสนับสนุนให้ดำเนินการศึกษาวิจัยอย่างจริงจังจนสำเร็จสามารถนำไปใช้เป็นต้นแบบ (protocol) โครงการวิจัยนี้จึงนำหลักการข้างต้นมาศึกษาทดลอง โดยผลสำเร็จของโครงการนี้จะมีการถ่ายทอดสู่เกษตรกรหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ด้วยการจัดฝึกอบรมและดูงานเพื่อให้เป็นมาตรฐานการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยรับรอง (certified cutting) ต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1 พัฒนาการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวในแปลงปลูกขยายพันธุ์ เพื่อให้ได้ผลผลิตอ้อยสุขภาพที่มีประสิทธิภาพสูงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ

2 ศึกษาวิจัยการผลิตกล้าพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวในสภาพโรงเรือนอนุบาลที่มีความแข็งแรง เจริญเติบโตเร็ว ปลอดโรคให้ผลผลิตสูง

3 ส่งเสริมให้เกษตรกรหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้องสามารถนำไปผลิตท่อนพันธุ์ปลอดโรคใบขาวใช้เองหรือให้บริการสมาชิกและบุคคลทั่วไป โดยการจัดการฝึกอบรมและผลิตคู่มือปฏิบัติการ (manual) ใช้ประกอบการอบรมหรือแจกจ่ายให้ผู้สนใจทั่วไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาการกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในท่อนพันธุ์ด้วยเทคนิค hot tetracyclin treatment เครื่องแช่ท่อนพันธุ์ และการศึกษาการผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ในแปลงปลูกทดลอง

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ได้วิธีการที่เหมาะสมในการกำจัดเชื้อโรคใบขาวในท่อนพันธุ์
- 1.4.2 ได้เทคนิคในการตรวจเชื้อโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย
- 1.4.3 ได้เครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีประสิทธิภาพ
- 1.4.4 ได้วิธีการปฏิบัติสำหรับกล้าพันธุ์ปลอดโรคในสภาพโรงเรือนและแปลงปลูก
- 1.4.5 ได้ข้อมูลการติดเชื้อโรคใบขาวของกล้าพันธุ์ปลอดโรคใบขาวในแปลงปลูก

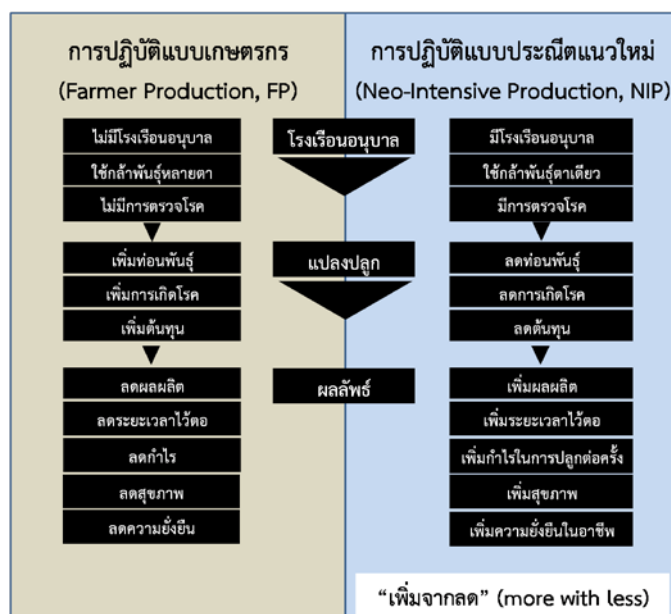
บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตอ้อยที่มีประสิทธิภาพดีทั้งด้านปริมาณและคุณภาพต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องทุกระยะครบวงจรการผลิตของอ้อย (เกษม, 2523) ทั้งอ้อยปี (cane) และอ้อยตอ (ratoon cane) ซึ่งมีคำแนะนำขั้นตอนวิธีการปฏิบัติในการบริหารจัดการไร่อ้อยของสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล (<http://oldweb.oscb.go.th/udon/All%20text/1.Article /01-Article%20P8.7a.htm>) โดยมีกระบวนการบริหารปัจจัยการผลิตที่สำคัญ ดังนี้ การปรับปรุงดินและสภาพพื้นที่ให้เหมาะสมกับการปลูกอ้อย ความชื้นที่พอเพียง พันธุ์อ้อยที่เหมาะสม การเตรียมดินที่ดี การปลูกอ้อยในเวลาที่เหมาะสม จำนวนลำต่อไร่เหมาะสม (ไม่ควรต่ำกว่า 10,000 ลำต่อไร่) ธาตุอาหารสมดุลและใช้ถูกวิธี และการจัดการโรค แมลง และวัชพืช

การปฏิบัติในการปลูกอ้อยของเกษตรกรที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มุ่งเน้นถึงปัจจัยการผลิตข้างต้นไม่ครบถ้วนทุกหัวข้อ มีส่วนน้อยที่ปฏิบัติตามจึงเป็นปัญหาทำให้การผลิตอ้อยของประเทศไทยได้ผลผลิตต่ำกว่าเกณฑ์เฉลี่ยของโลก ถึงแม้จะมีความพยายามส่งเสริมสนับสนุนจากหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทั้งภาครัฐและเอกชนก็ตาม เกษตรกรจะให้ความสำคัญกับเรื่องของพันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตสูงเป็นอันดับแรก แต่จะไม่คำนึงถึงคุณภาพหรือสุขภาพของท่อนพันธุ์นั้นว่ามีความสะอาด ปราศจากโรคหรือไม่ นอกจากนี้ยังไม่ได้ศึกษาในรายละเอียดว่าพันธุ์ที่นิยมปลูกในพื้นที่หนึ่งให้ผลผลิตสูงนั้นจะเหมาะสมที่จะนำมาปลูกในพื้นที่ของเกษตรกรเองหรือไม่ ซึ่งจะเป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำให้ได้ผลผลิตอ้อยต่ำทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ

แนวทางการวิจัยนี้อาศัยกรอบแนวคิด “เพิ่มจากลด” (more with less) ของระบบ Sustainable Sugarcane Initiative (SSI) เป็นพื้นฐานเพื่อพัฒนาการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Production, NIP) ให้เหมาะสมกับการปลูกอ้อยของไทยโดยยึดหลัก “เพิ่มจากลด” กล่าวคือ เพิ่มในสิ่งที่เป็นประโยชน์และลดในสิ่งที่ไม่เป็นประโยชน์ เพื่อให้ได้ผลตอบแทนสูงสุดทั้งปริมาณและคุณภาพ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 1 ซึ่งจะช่วยให้การผลิตอ้อยของเกษตรกรได้รับกำไรเพิ่มจากผลผลิตอ้อยที่มีคุณภาพดีและปริมาณสูง จากการลดการเกิดโรค การลดจำนวนท่อนพันธุ์ปลูก และการลดค่าใช้จ่ายในการลงทุนกำจัดศัตรูพืช ซึ่งผลสำเร็จของโครงการนี้จะมีการถ่ายทอดสู่เกษตรกรหรือหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง โดยการจัดฝึกอบรมและดูงาน เพื่อให้เป็นมาตรฐานการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยรับรอง (certified cutting) ต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 1 แผนผังเปรียบเทียบการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยระหว่างวิธีการของเกษตรกร (Farmer’s Production, FP) กับวิธีการผลิตแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Production, NIP) โดยยึดแนวคิด “เพิ่ม จาก ลด” (More with Less)

ธนากรและคณะ (2526) ได้สำรวจโรคของอ้อยในประเทศไทยที่ระบาดมากมายทั้งเกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไฟโตพลาสมา และไวรัส เป็นต้น แต่ที่พบโรคที่เป็นปัญหาสำคัญที่สุด คือ โรคใบขาวอ้อย ที่มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา รองลงมาคือโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคเขม่าดำ โรคเส้นใบแดง โรคราสนิม และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคใบด่างอ้อย เป็นต้น โดยโรคต่างๆ ข้างต้นจะพบเข้าทำลายอ้อยแต่ละสายพันธุ์มากน้อยไม่เท่ากัน นอกจากนี้ยังขึ้นกับพื้นที่ปลูกในแต่ละภูมิภาค (สุภาพร และคณะ, 2545; วันทนี, 2547)

โรคใบขาวอ้อยมีรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทยที่ จ. ลำปาง ปีพ.ศ. 2497 โดยพบเพียงเล็กน้อยแต่ต่อมาในปีพ.ศ.2516 ได้ระบาดไปหลายจังหวัดทั่วประเทศ (ธนากร และคณะ, 2526; นิพนธ์, 2553) จนทำให้ต้องมีการเผาทำลายอ้อยที่เป็นโรคไป 20,000 ไร่ (ธีระ, 2532) ต่อมาในปีพ.ศ. 2550/51 มีรายงานเกิดโรคนี้ระบาดทั่วประเทศ 185,221 ไร่ และพบระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือถึง 105,170 ไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2551)

เชื้อสาเหตุโรคใบขาวจำแนกกว่าเป็นเชื้อไฟโตพลาสมา (Phytoplasma) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Candidatus Phytoplasma* กลุ่ม 16SrXI (subgroup 16SrXI-B) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย โดยเชื้อชนิดนี้ไม่มีผนังหุ้มเซลล์ (no cell wall) ซึ่งต่างจากเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชโดยทั่วไปทำให้ไม่ไวต่อการปฏิชีวนะเพนิซิลิน (penicillin) แต่จะไวต่อการปฏิชีวนะเตตราไซคลิน (tetracycline) เชื้อนี้อาศัยอยู่ในท่ออาหาร (phloem) ในบริเวณ sieve tube และ companion cells ซึ่งเชื้อสามารถถ่ายทอดโดยติดไปกับท่อนพันธุ์เป็นโรคและมีแมลงพาหะ คือ เพลี้ยจักจั่นปีกลาย (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovittatus*) ถ่ายทอดโรคในลักษณะ persistent ต้องใช้เวลาให้เชื้อพักตัวและเพิ่มปริมาณในแมลง การตรวจสอบเชื้อโรคใบขาวมีรายงานไว้หลายวิธีทั้งเทคนิคทางซีรั่มวิทยา (serology) และทางอณูชีวโมเลกุล (molecular) โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาพัฒนาให้มีความสามารถตรวจสอบเชื้อได้รวดเร็ว แม่นยำ เช่น PCR (Nagashima *et. al.*, 1994) หรือ nested-PCR (Klingkong and Seemuller, 1993) เป็นต้น

การป้องกันกำจัดโรคใบขาวนั้นได้มีการศึกษาหาวิธีกำจัดโรคนี้หลายวิธีแต่ส่วนใหญ่จะเน้นที่การผลิตท่อนพันธุ์ปลอดโรคเพราะท่อนพันธุ์เป็นสาเหตุตั้งต้น (primary inoculums) ที่สำคัญของการแพร่ระบาดโรคใบขาว โดยวิธีที่นิยมได้แก่การแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ เช่น น้ำร้อน 50 °C นาน 2 ชั่วโมง (Long Hot Water Treatment; LHWT) หรือน้ำร้อน 52 °C นาน 30 นาที และพักไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่น้ำร้อน 50 °C นาน 2 ชั่วโมง (Dual Hot Water Treatment; DHWT) (อดิศักดิ์ และคณะ, 2555) หรือรายงานวิจัยอื่นๆ (วิมลรัตน์ และคณะ, 2541 และ Kaewmanee and Hanboonsong, 2011) แต่ไม่มีวิธีการใดประสบความสำเร็จในการฆ่าเชื้อสาเหตุที่อยู่ติดในท่อนพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากวิธีการกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในท่อนพันธุ์ด้วยการใช้น้ำร้อนเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถทำลายเชื้อได้ทั้งหมด ซึ่งต่างจากรายงานของนิวัฒน์ และนิพนธ์ (2523) ที่ใช้เตตราไฮดรอลินเข้มข้น 500 ppm ผสมในน้ำร้อนที่ 54 °C เป็นเวลานาน 30-60 นาที ผลการทดลองพบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อไฟโตพลาสมาที่อยู่ในท่อนพันธุ์ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำท่อนพันธุ์ที่ผ่านกระบวนการข้างต้นไปปลูกในแปลงปลูกอ้อยสามารถเจริญเป็นปกติจนถึงอ้อยต่อที่ 1 โดยไม่แสดงอาการของโรคใบขาว

เนื่องด้วยยาปฏิชีวนะเตตราไฮดรอลินมีฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อได้ นอกจากนี้ยังมียาปฏิชีวนะกลุ่มอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ต่อเชื้อในด้านต่างๆ เช่น ยับยั้งหรือขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์ยับยั้งการสังเคราะห์สารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก ขัดขวางกระบวนการแบ่งตัวและการถอดรหัสพันธุกรรม เป็นต้น (กำธร, 2558) ซึ่งเป็นแนวทางที่จะนำมาใช้ร่วมกับการกำจัดเชื้อด้วยการแช่น้ำร้อนให้มีประสิทธิภาพต่อไป

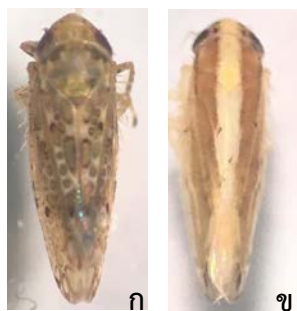
จากผลงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารปฏิชีวนะในน้ำร้อนจะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้น้ำร้อนเพียงอย่างเดียว ซึ่งนำมาสู่โครงการวิจัยนี้ที่จะนำเทคนิคการกำจัดเชื้อโรคใบขาวด้วยการแช่น้ำร้อนร่วมสารละลายปฏิชีวนะต่างๆ โดยจะมีการศึกษากลุ่มตัวยาของสารปฏิชีวนะเพิ่มเติมจากการใช้เตตราไฮดรอลินร่วมกับการพัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและกระจายอุณหภูมิได้อย่างทั่วถึง



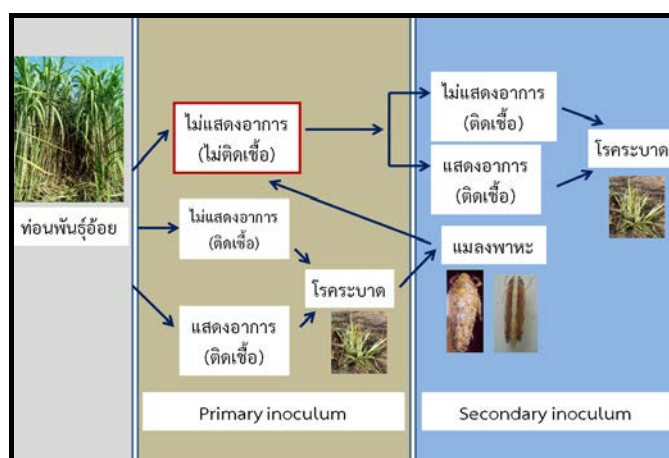
ภาพที่ 2 อาการใบขาวในอ้อยที่ปลูกจากท่อนพันธุ์เป็นโรค อ.เขาสวนกวาง จ.ขอนแก่น ในปี พ.ศ.2520 โดยกอที่ขุดขึ้นมาโดย ผศ.ดร.เกษม สุขสถาน (ที่มา: นิพนธ์ ทวีชัย, 2553)



ภาพที่ 3 การระบาดของโรคใบขาวในอ้อยต่อสามารถแพร่ระบาดได้อย่างกว้างขวาง



ภาพที่ 4 แมลงพาหะของโรคใบขาวได้แก่เพลี้ยจักจั่นปีกลาย (*Matsumuratettix hiroglyphicus*) (ก) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว (*Yamatotettix flavovittatus*) (ข)



ภาพที่ 5 แผนผังการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยจากท่อนพันธุ์

โรคใบด่างอ้อย (Sugarcane mosaic) เกิดจากเชื้อไวรัส Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) Sugarcane Streak Mosaic Virus (SCSMV) โดยมีเพลี้ยอ่อน (*Aphis* spp.) หลายชนิดเป็นแมลงพาหะ ถ่ายทอดโรคในลักษณะ non-persistent ที่ถ่ายทอดโรคได้ทันทีโดยไม่ต้องอาศัยเวลาให้เชื้อพักตัวเพิ่มปริมาณในแมลง การกำจัดโรคนี้แนะนำให้ใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรคและควบคุมแมลงพาหะนอกจากนี้อาจใช้การแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อน 54°C นาน 15 นาที (ธีระ, 2532, ธีระ และ ปราณี, 2525) ส่วนการตรวจเชื้อโรคนี้ในอ้อยมีรายงานการใช้เทคนิค PCR ของลำดับพันธุกรรม เฉพาะ (specific) ของเชื้อโรคมาช่วยตรวจสอบทำให้เกิดความแม่นยำมากยิ่งขึ้น (Gomez *et. al.*, 2009)



ภาพที่ 6 ภาพอาการโรคใบด่าง

ในส่วนโรคที่เกิดจากเชื้อราการตรวจสอบวินิจฉัยจะดูจากลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนส่วนต่างๆของอ้อยและศึกษาทาง สันฐานวิทยาของเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ว่าการสร้างสปอร์ ก้านชูสปอร์ โครงสร้างห่อหุ้มสปอร์ ลักษณะของสปอร์ (Barnett and Hunter, 1998) เชื้อราส่วนใหญ่จะระบาดโดยปลิวไปในอากาศ ละอองน้ำ และดินเป็นส่วนใหญ่ การ ติดมากับท่อนพันธุ์ภายในจะมีโรคเขม่าดำและโรคเหี่ยวเน่าแดง ส่วนโรคอื่นๆจะมีสปอร์ติดไปกับผิวนอกของท่อนพันธุ์ จึงมีคำแนะนำให้กำจัดโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์โดยการแช่น้ำร้อน 50 °C นาน 2-3 ชั่วโมง หรือแช่ในสารละลายสาร กำจัดเชื้อรา (fungicides)



ภาพที่ 7 อาการของโรคราสนิม (ก) และอาการของโรคเขม่าดำ (ข)

ส่วนการป้องกันกำจัดการระบาดของเชื้อโรคในแปลงจะมีการแนะนำโดยทั่วไปตามหลักการป้องกัน กำจัดโรค (Agrios, 2005; ชีระ และปราณี, 2525) แตกต่างไปตามชนิดของโรคโดยจะมีกลยุทธ์การจัดการ โรค (นิพนธ์, 2553) ที่สำคัญคือ

1) การลดแหล่งของเชื้อโรค (reduce source of inoculum) โดยพยายามลดแหล่งของเชื้อเริ่มต้นหรือ ทำลายให้หมดไป

2) การลดอัตราการเข้าทำลาย (reduce rate of infection) โดยพยายามไม่ให้โรคที่เกิดขึ้นแล้วมีการแพร่ กระจายไปสู่ต้นใหม่ ซึ่งทำได้หลายวิธีที่แต่ที่นิยมคือการใช้สารเคมีหรือสารชีวภาพในการกำจัดเชื้อโรคหรือแมลง พาหะ ตลอดจนวิธีอื่นๆ เช่น การปลูกพืชสลับกันการระบาด

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะเน้นการกระทำในกลยุทธ์ที่ 1) กับสภาพโรงเรือนอนุบาล เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของ เชื้อโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์ ส่วนกลยุทธ์ที่ 2) จะเน้นในสภาพแปลงปลูก เพื่อเป็นการป้องกันการแพร่ระบาดของ เชื้อโรคที่มากับแมลงพาหะ

เอกสารอ้างอิง

เกษม สุขสถาน. 2523. อ้อย. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. เล่ม 5. หน้า 64-107.

เกียรติศักดิ์ จีระเกียรติ. 2557. เอกสารประกอบคำบรรยายเรื่องความท้าทายของอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลไทย

เมื่อเข้า AEC ในสัมมนาเชิงวิชาการ “งานวิจัยอ้อยและน้ำตาล” สำนักงานประสานงานชุดโครงการวิจัยด้าน อ้อยและน้ำตาล สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย โรงแรมพูลแมนจี พัทยาชลบุรี 18 กันยายน 2557.

กำธร มาลาธรรม. 2558. หลักการเข้ายาปฏิชีวนะในเวชปฏิบัติทั่วไป. (<http://med.mahidol.ac.th/med/sites/default/files/public/pdf/medicinebook1/Antibiotics%20%E0%B8%AD%20%E0%B8%81%E0%B8%B3%E0%B8%98%E0%B8%A3.pdf>).

ธนากร จารุพัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, นิพนธ์ ทวีชัย และศศิณัฐ แสงวงศ์. 2526. โรคอ้อยในประเทศไทย. สมาคม นักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ ฯ 180 หน้า

ธีระ สุตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชในประเทศไทย. หจก. ฟีนีฟลิสซี่ กรุงเทพฯ ฯ 310 หน้า.

- ธีระ สุตะบุตร และ ปราณี (สมุทรสินธุ์) ฮัมเมอลิงค์. 2525. โรคพืช. สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 7. หน้า 88-125.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2553. โรคแบคทีเรียของพืชและการจัดการโรค. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 291 หน้า.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2524. การใช้ชิ้นตาอ้อยทำแปลงขยายพันธุ์ที่ปราศจากโรค. ข้าวอ้อยและน้ำตาล ชมรมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย ปีที่ 2 ฉบับที่ 3 หน้า 3-6.
- นิพนธ์ ทวีชัย. 2523. ข้อเปรียบเทียบของการปลูกอ้อยโดยใช้ชิ้นตาในด้านการป้องกันกำจัดโรค ข้าวอ้อยและน้ำตาล ชมรมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 หน้า 2-4.
- นิรนาม (<http://oldweb.oscb.go.th/All%20text/1.Article%20P8.7a.htm>)
- นิวัติ เสนาะเมือง และ นิพนธ์ ทวีชัย. 2523. การใช้สารละลายเตตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์ในน้ำร้อนป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย. รายงานประชุมทางวิชาการครั้งที่ 18 สาขาพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- วิมลรัตน์ ศุภรินทร์ อนุสรณ์ กุศลวงศ์ และวีรชาติ แสงสิทธิ์. 2541. การฆ่าเชื้อในท่อนพันธุ์อ้อยโดยการแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน. รายงานผลการวิจัย ปี 2541 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น. หน้า 85-89.
- วันทนี อ้วนนิชัย. 2547. โรคอ้อย. หน้า 45-56. ใน เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง และคณะ เอกสารวิชาการอ้อย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 147 หน้า.
- สุภาพร กลิ่นคง คณินันต์ เจริญวรการ รณภพ บรรเจิดเชิดชู และชลิตา เล็กสมบูรณ์. 2545. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปี 2544-45. โครงการการสำรวจโรคอ้อยในเขตภาคกลางของประเทศไทย. สวพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2558. เอกสารประกอบการฝึกอบรม โครงการจัดทำต้นทุนผลผลิตและถ่ายทอดความรู้ เพื่อลดต้นทุนการผลิตอ้อยของเกษตรกร ในปีเพาะปลูก 2557/58. สืบค้นจาก http://www.sugarzone.in.th/cane/cost_cane5758.pdf.
- สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2557. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย ปีการผลิต 2556/2557. สืบค้นจาก <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/9239193.pdf>.
- สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2556. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย ปีการผลิต 2555/2556. สืบค้นจาก <http://www.oscb.go.th/th/home/index.php>.
- สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2551. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2550/2551.
- อดิศักดิ์ คำนวนศิลป์ รัชชี่ เจริญสถาพร นิลุบล ทวีกุล อมรรักษ์ คัดใจเดียว และดารารัตน์ มณีจันทร์. 2555. การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตอ้อยสะอาดที่ผ่านการกำจัดเชื้อโรคใบขาว. เกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3:254-266
- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th. ed. Elsevier Academic Press, California. 922 p.
- Barnett H. and B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Fourth Edition. APS Press. St Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.
- Hodgetts J, Tomlinson J, Boonham N, Gonzalez-Martin I, Nikolic P, Swarbrick P, et al. Development of rapid in-field loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for phytoplasmas. B Insectol. 2011;64: S41-S42.

- Kaewmanee, C. and Hanboonsong, Y. 2011. Evaluation of the efficiency of various treatments used for sugarcane white leaf phytoplasma control. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): 197-198.
- Gomez, M., Rago, A.M. and Serino, G. 2009. Rapid identification of viruses causing sugarcane mosaic by direct sequencing of RT-PCR products from crude extract: A method for large scale virus surveys. *J. of Virological Methods* 157(2):188-194.
- ICRI SAT-WWF Project, 2009. Sustainable Sugarcane Initiative Training Manual (<http://asset.panda.org/downloads/ssi-manual.pdf>.)
- Klinkong, S., and E. Seemuller. 1993. Detection and identification of mycoplasma-like organism associated with sugarcane white leaf disease using cloned extrachromosomal DNA prob. *Kasetsart Journal* 27: 98-103.
- Nakashima, K., W. Chaleeprom, P. Wongkew and P. Sirithorn. 1994. Detection of mycoplasma-like organisms associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA prob. *JIRCAS.J.* 1:57-67.

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาผลกระทบของโรคใบขาวที่ความรุนแรงต่างๆ ต่อความหวานอ้อยและรายได้

1 ทำการสำรวจระดับความรุนแรงของโรคใบขาวจากแปลงปลูกเกษตรกร ทำการแบ่งระดับความรุนแรงของโรคใบขาวตามอาการของโรคที่ปรากฏ

2 ทำการวัดค่าความหวานของอ้อยด้วยเครื่อง refractometer ตามระดับความรุนแรงของโรคใบขาวที่ได้จัดแบ่งไว้ตามข้อ 1 โดยทำการสุ่มระดับความรุนแรงละ 10 ลำจากแปลงปลูกเกษตรกร จำนวน 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 แปลง

3 ทำการวัดค่าความหวานของอ้อย (CCS = Commercial Cane Sugar) ตามระดับความรุนแรงต่างๆ ของโรคใบขาว โดยทำการสุ่มวัดจำนวน 4 ครั้งๆละ 2 ลำที่ระดับความรุนแรงต่างๆ จำนวน 2 สายพันธุ์

3.2 การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย

3.2.1 การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Conventional PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *secA* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor* (5'GTTTTATATGGATGCTAATCGTTTT-3') และ *secArev* (5'CTAYTGTTCTTCCTGTAAATTGATC-3') (ธีรวิทย์ และ ศุจิรัตน์, 2558) โดยมีปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25µl ประกอบด้วย 1x DreamTaq® buffer (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.), 2.5 uM dNTPs, 10 uM *secAfor*, 10 uM *secArev*, 1 ul DNA template และ 0.625U DreamTaq® (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.) และ dH₂O เพื่อปรับปริมาตรสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ T-Professional, (Biometra, ประเทศเยอรมนี) โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1. เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 2. แยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 3. ไพร์เมอร์จับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4. สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที 5. สังเคราะห์สายดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ ตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 1.0% agarose gel ใน 0.5× TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที ย้อมเจลด้วยสาร ethidium bromide ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตบันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างอ้อยที่งอกและแสดงอาการใบขาวเป็น positive control และอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดโรคใบขาวเป็น negative control

3.2.2 การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Real-time PCR

นำดีเอ็นเอ มาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor* (5'GTTTTATATGGATGCTAATCGTTTT-3') และ *secArev* (5'CTAYTGTTCTTCCTGTAAATTGATC-3') (ธีรวิทย์ และ ศุจิรัตน์, 2558) โดยใช้ FastStart Essential DNA Green Master (Roche, ประเทศเยอรมนี) ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 20µl ประกอบด้วย 10ul Master Mix (FastStart Essential DNA Green Master: Roche, ประเทศเยอรมนี) ซึ่งประกอบด้วย FastStartTaq DNA polymerase, buffer, dNTPs, SYBR Green I dye และ MgCl₂ นอกจากนี้เติม 1ul DNA Template, 1ul 10uM *secAfor*, 1ul 10uM *secArev* และปรับปริมาตรด้วย

dH₂O จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง รุ่น Eppendorf Mastercycler[®]ep RealPlex4 (Eppendorf, อังกฤษ) โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1. เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) 95 องศาเซลเซียส 4 นาที 2. แยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 3. โพรเมอร์จับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4. สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที 5. สังเคราะห์สายดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า Melting temperature (tm) cal. ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ถึง 95 องศาเซลเซียส 15 วินาทีตรวจสอบผลโดยดูจากกราฟของ melting curve

3.2.3 การหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวด้วยเทคนิค Real-time PCR

1) การโคลนยีน *secA*

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) ของยีน *secA* จากตัวอย่าง S4 ที่มีขนาด 275 bp ปริมาตร 200 μ l มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด High Pure PCR product Purification Kit (Roche, German) โดยเติม Binding buffer 1,000 ไมโครลิตรกลับหลอด microcentrifuge tube ไปมาเบาๆ ดูดตัวอย่างใส่ลงใน minicolumn นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาทีทิ้งส่วนใส เติม wash buffer 1,000 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ เป็นเวลา 1 นาทีทิ้งส่วนใสเปิดฝาดังทิ้งไว้ 1 นาทีและเติม wash buffer 400 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบเป็นเวลา 1 นาทีทิ้งส่วนใส เปิดฝาดังทิ้งไว้ 1 นาที ย้าย minicolumn ลงในหลอด microcentrifuge tube เติม Elution buffer 200 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบเป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง minicolumn จะได้ purified PCR product 200 μ l ตรวจสอบคุณภาพ purified PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer จากนั้นเก็บ purified PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปใช้ต่อไป

นำ purified PCR product เชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T Easy vector (Promega, USA) โดยใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร, 2x Rapid, T4 DNA ligation buffer 5 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase (3 weiss unit/ μ l) 1 ไมโครลิตร, pGEM[®]-T Easy vector (50 ng) 1 ไมโครลิตรและน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 1 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation โดยนำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะใส่ลงไปในหลอด microcentrifuge tube ที่มี competent cells ของเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วินาที แล้วนำกลับมาแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว Soc ที่ยังไม่ได้เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ทำการตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาทีเทอาหารออกให้เหลือประมาณ 200 ไมโครลิตรละลายตะกอนเซลล์ให้ผสมให้เข้ากันกับอาหารที่เหลือแล้วนำมา spread บนอาหารแข็ง 2XYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรรอให้ผิวหน้าอาหารแห้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่เจริญบนอาหาร 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินโดยใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีมาขีด (streak) บนอาหารแข็ง 2xYT ที่ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็น master plate

2) การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- ตรวจสอบด้วยวิธี colony PCR

ตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยโคลนินบน master plate แล้วนำมาแตะที่กันหลอด PCR จากนั้นเติม PCR master mix ให้ได้ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตรโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.3

- ตรวจสอบด้วยวิธี conventional PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ลูกผสม หรือ recombinant clone โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วแตะโคลนินบน master plate ที่ให้ผลของ colony PCR เป็นบวกมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรบ่มพร้อมเขย่าที่ 150 รอบต่อนาทีที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมงจากนั้นสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี alkaline lysis โดยนำสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที เทอาหารทิ้ง เก็บตะกอนเซลล์เพื่อใช้สกัดพลาสมิดสายผสม จากนั้นเติม solution I ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วย vortex เติม solution II ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอด microcentrifuge tube ไปมาเบาๆ เติม solution III ปริมาตร 150 ไมโครลิตรแล้วกลับหลอด microcentrifuge tube ไปมาเบาๆ หลังจากนั้นนำไปปั่นในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบน (ประมาณ 400 ไมโครลิตร) ใส่หลอด microcentrifuge tube หลอดใหม่ เติม Isopropanol 1:1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้งแล้วเก็บตะกอนพลาสมิดสายผสม เติม 70% EtOH ที่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบเป็นเวลา 5 นาที ดูด 70% EtOH ออกอย่างระมัดระวัง ปล่อยให้แห้งประมาณ 30 นาที โดยเปิดฝาลอด เพื่อให้ EtOH ระเหยออกให้หมด หลังจากนั้นละลายตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมด้วย dH₂O+RNase ประมาณ 30 ไมโครลิตรเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

นำพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้จากข้างต้นมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Conventional PCR ดังข้อ 1.3 โดยใช้พลาสมิดเป็น DNA template จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด High Pure PCR product Purification Kit (Roche, German) ด้วยวิธีเช่นเดียวกับในขั้นตอนการโคลนนิ่ง จากนั้นส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ กับบริษัท Solgent Co., Ltd. (63-10, Hwaamdong, Yuseong-Gu, Daejeon City, Korea, South Korea)

3) หาคความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR และ Conventional PCR โดยวิธีการเจือจาง พลาสมิดสายผสม

- หาคความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR

นำพลาสมิดสายผสมจากตัวอย่างโคลน PG-S4 (*E. coli* secA recombinant clone) ที่มีปริมาณดีเอ็นเอ 44.47 ng/ μ l มาเจือจางระหว่าง 10^{-1} – 10^{-12} แล้วนำมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ secAfor (5'GTTTTATATGGATGCTAATCGTTTT-3') และ secArec (5'CTAYTGTTCTTCCTGTAAATTGATC-3') โดยใช้ FastStart Essential DNA Green Master (Roche, ประเทศเยอรมนี) ในปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 20 μ l ประกอบด้วย 10 μ l Master Mix (FastStart Essential DNA Green Master: Roche, ประเทศเยอรมนี) ซึ่งประกอบด้วย FastStartTaq DNA polymerase, buffer, dNTPs, SYBR Green I dye และ MgCl₂ นอกจากนี้เติม 1 μ l DNA Template (ใช้พลาสมิดที่เจือจาง), 1 μ l 10 μ M secAfor, 1 μ l 10 μ M secArev และปรับปริมาตรด้วย dH₂O จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริงรุ่น Eppendorf Mastercycler[®]ep RealPlex4 (Eppendorf, อังกฤษ) โดยมีขั้นตอนดังนี้ 1. เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอ (initial denaturation) 95 องศา

เซลเซียส 4 นาที 2. แยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 3. โพรเมอร์จับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4. สังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที 5. สังเคราะห์สายดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 เป็นวงจรลูกโซ่ 30 รอบ จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า Melting temperature (tm) cal. ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ถึง 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที ตรวจสอบผลโดยดูจากกราฟของ Melting curve

- หาความไวของปฏิกิริยา conventional PCR

นำพลาสมิดสายผสมที่เจือจาง 10^{-1} - 10^{-12} มาตรวจสอบหาความไวของปฏิกิริยา conventional PCR โดยใช้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 2.3 แต่ใช้ DNA template เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอแทน

3.3 การพัฒนาเครื่องแช่ข้อตาอ้อย

ต้นแบบเครื่องแช่ข้อตาอ้อยประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ 1) มอเตอร์ ขนาด 2 แรงม้า (220 โวลต์) 2) เกียร์ทดและชุดส่งกำลังโดยใช้เฟืองโซ่ 3) ชุดควบคุมการทำงาน 4) อุปกรณ์ยึดถัง 5) ถาดรับ/เทข้อตาอ้อย 6) โครงเครื่อง และ 7) ถังแช่ข้อตาอ้อยขนาด 200 ลิตรซึ่งถังแช่ข้อตาอ้อยสามารถถอดแยกออกจากเครื่องได้

หลักการทำงานของเครื่องแช่ข้อตาอ้อยมีแนวคิดในการพัฒนามาจากเครื่องผสมปุ๋ยหมักแบบถังหมุน (ศุภกิจดต์, 2553) โดยเปลี่ยนขนาด วัสดุ และติดตั้งอุปกรณ์ทำความร้อน และชุดควบคุม ให้เหมาะกับแช่ข้อตาอ้อย การทำงานของเครื่องเริ่มจากการส่งกำลังจากมอเตอร์ผ่านพูล์ตัวขับ สายพาน พูล์ตัวตาม เกียร์ทด ชุดส่งกำลังแบบเฟืองโซ่ ซึ่งเชื่อมต่อกับเพลาลูกเบี้ยวที่มีอุปกรณ์ยึดถังติดอยู่ ดังนั้นเมื่อมอเตอร์หมุนจะส่งกำลังทำให้อุปกรณ์ยึดถังหมุนด้วย โดยสามารถหมุนถังแช่ข้อตาอ้อยเพื่อรับ หรือเทข้อตาอ้อยออกมาได้ เครื่องสามารถควบคุมอุณหภูมิและตั้งเวลาได้ โดยมีขนาดบรรจุปริมาณน้ำได้ 200 ลิตร หรือ แช่ข้อตาอ้อยได้ครั้งละประมาณ 1,000 ข้อตา สามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวกและมีการให้ความร้อนกับน้ำที่ต้มได้รวดเร็ว

1 ขั้นตอนและวิธีการทำเครื่อง

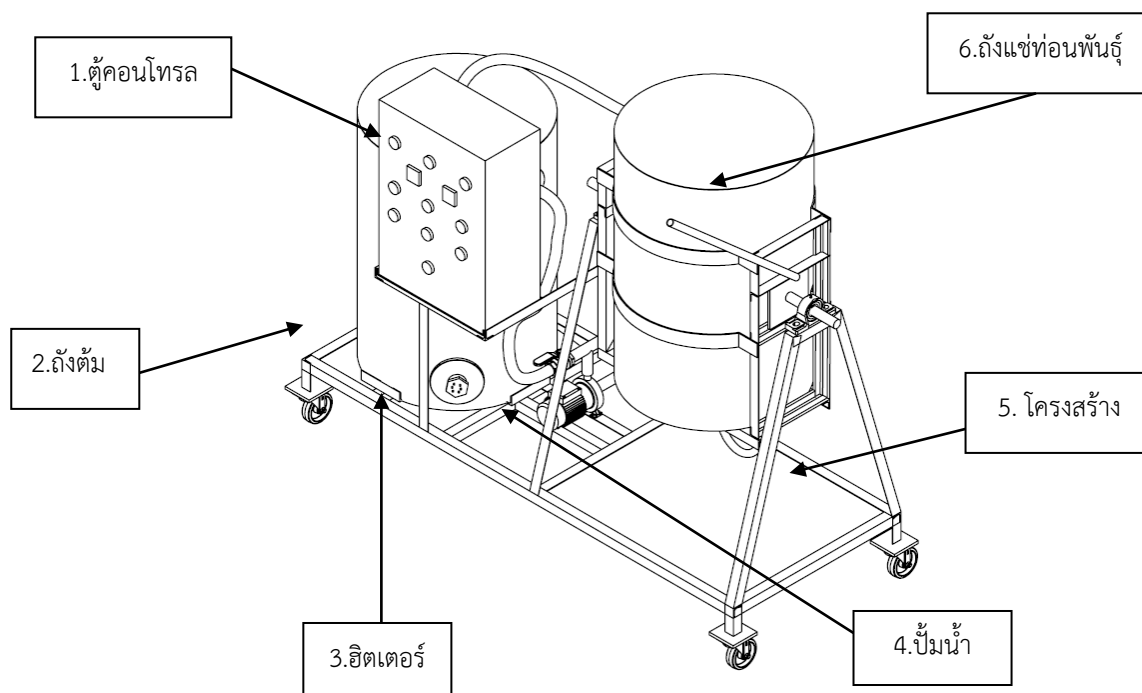
วัสดุและอุปกรณ์

- 1) เหล็กฉาก
- 2) ตู้เชื่อม Inverter WELPRO รุ่น WELARC200
- 3) แท่นตัดไฟเบอร์ MAKITA รุ่น 2414NB ขนาด 14".
- 4) เครื่องกลึงYAM 4 ฟุต
- 5) ถังเหล็กขนาด200 ลิตร
- 6) ตู้คอนโทรล
- 7) ปั๊มน้ำ EBARA รุ่น CDX 90/10
- 8) ฮีตเตอร์ขนาด 12,000วัตต์
- 9) ข้อตาอ้อยแบบข้อตายาว 7 cm

2 ขั้นตอนการพัฒนาเครื่อง

1) การออกแบบเครื่อง

การออกแบบเครื่องเริ่มจากการเขียนแบบโดยใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในการออกแบบและเขียนแบบ (CAD) จากนั้นกำหนดวัสดุอุปกรณ์และขนาดที่ใช้ในการสร้างเครื่อง ประเมินวัสดุอุปกรณ์และจัดหามาใช้ในการสร้างให้พอดีกับการสร้างโดยไม่ต้องหาซื้อของบ่อยครั้งจะทำงานได้ตามแผนที่วางไว้



ภาพที่ 8 แบบอุปกรณ์แช่ท่อนพ่นน้ำอ้อยแบบข้อตา

1. ตัวควบคุม ทำหน้าที่ควบคุมและกำหนดอุณหภูมิฮีตเตอร์และควบคุมการทำงานของปั๊มน้ำ
2. ถังต้ม ใช้ในการต้มน้ำให้ได้ตามอุณหภูมิที่กำหนดไว้
3. ฮีตเตอร์ ใช้ในการให้ความร้อนถังต้ม
4. ปั๊มน้ำ ทำหน้าที่หมุนเวียนน้ำในถังทั้ง 2 ถังเพื่อให้เกิดการถ่ายเทความร้อนจากถังต้มไปยังแช่ท่อนพ่นน้ำ
5. โครงสร้าง ทำหน้าที่เป็นฐานรับน้ำหนักและยึดรวมอุปกรณ์ต่างๆไว้ในบริเวณโครงสร้างเดียวกัน
6. ถังแช่ท่อนพ่นน้ำ ทำหน้าที่แช่ท่อนพ่นน้ำให้ได้อุณหภูมิตามที่ต้องการ

2) การคำนวณหาฮีตเตอร์

การคำนวณหาขนาดฮีตเตอร์ กำหนดปริมาณน้ำ 200 ลิตรทำอุณหภูมิจาก 30 c° ไปยังอุณหภูมิ 100 c° ภายในเวลา 1 ชั่วโมง (น้ำ 200 ลิตร = 200 kg)

จากสูตร $Q = mcp \Delta T/t$

$$q = \frac{(200kg)(4.2 \frac{KJ}{kgc})(100c - 30c)}{3600s}$$

$$q = 16.33 \text{ KJ/sec}$$

$$q = 16.33 \text{ kw}$$

หลังจากคำนวณเสร็จก็นำค่าที่คำนวณได้ไปสั่งทำฮีตเตอร์

3) การคำนวณหาเครื่องสูบน้ำ

การสร้างเครื่องจะต้องคำนวณหาขนาดเครื่องสูบน้ำที่จะนำมาใช้กับอุปกรณ์แช่ท่อนพ่นน้ำอ้อยแบบข้อตาเพื่อหมุนเวียนน้ำในการแช่ท่อนพ่นน้ำ (400 ลิตร/ชม.) ดังนี้

$$\text{จากสูตร } W_{HP} = (Q \times H_{TDH})/273$$

เมื่อ Q = อัตราการไหล, m^3/hr .

H_{TDH} = เสดจลน์ทั้งหมด, m

จากโจทย์ $Q = \text{m}^3 / \text{hr}$. ดังนั้น

$$1,000 \text{ ลิตร} = 1 \text{ m}^3$$

$$400 \text{ ลิตร} = 400/1,000 = 0.4 \text{ m}^3$$

$$W_{HP} = 0.4 \times 2/(273)$$

$$= 0.00293 \text{ HP}$$

4) การประกอบเครื่อง

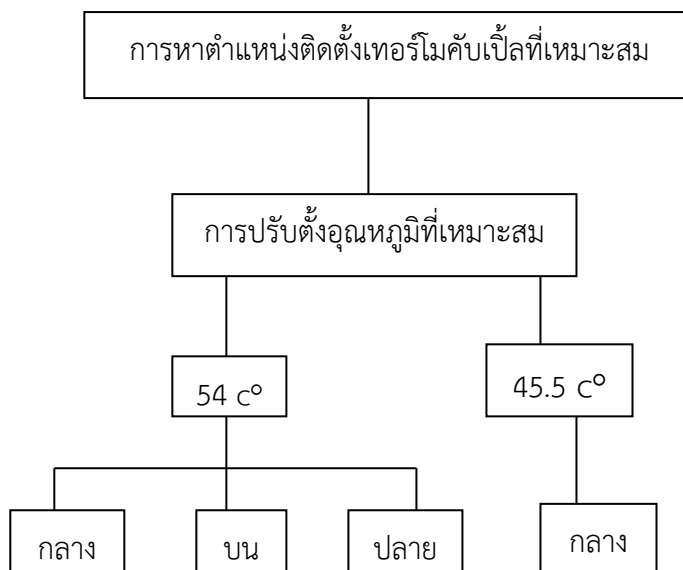
1. โครงสร้างที่เชื่อมเสร็จแล้วนำล้อมาติดตั้ง
2. นำถังติดตั้งบนโครงสร้างที่เตรียมไว้แล้ว
3. ติดตั้งปั้มน้ำตามตำแหน่งที่วางไว้
4. เดินท่อปั้มน้ำไปตามตำแหน่งที่ออกแบบไว้
5. ติดตั้งฮีตเตอร์ให้ตรงตามตำแหน่งที่ออกแบบ
6. ติดตั้งตู้ควบคุมและเดินสายไฟ
7. ตรวจสอบเช็คทุกส่วนที่ทำมาพร้อมเก็บรายละเอียด
8. ทาสีตัวเครื่องและติดตั้งฉนวนกันความร้อนที่ถังต้มและถังแช่ท่อนพันธุ์

3 ขั้นตอนและวิธีการทดสอบอุปกรณ์

ในการทดสอบอุปกรณ์ของผู้วิจัย จะทดสอบหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการติดตั้งเทอร์โมคัปเปิ้ล และทดสอบอุณหภูมิถังต้มให้ได้อุณหภูมิที่ต้องการจึงจะทดสอบการหมุนเวียนน้ำไปยังถังแช่ โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้

3.1 การทดสอบโดยไม่ใช้ระบบน้ำหมุนเวียน

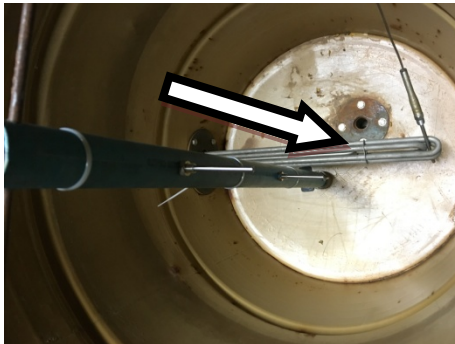
ในการทดสอบจะแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 9)



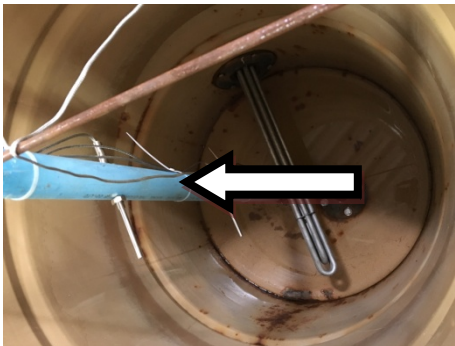
ภาพที่ 9 แผนผังการทดสอบ

ขั้นตอนที่ 1 ทำการทดสอบการวางสายเทอร์โมคัปเปิ้ล 3 ตำแหน่งดังภาพที่ 10

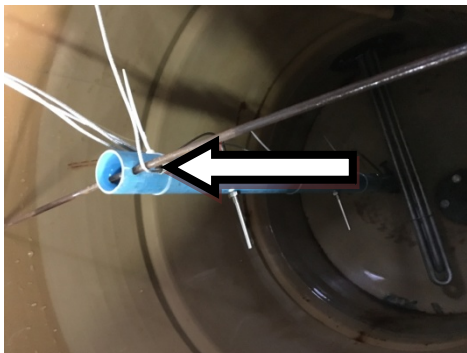
1. วางไว้บริเวณปลายฮีตเตอร์



2. วางไว้กลางฮีตเตอร์



3. วางไว้บริเวณกลางถังใกล้ผิวหน้า



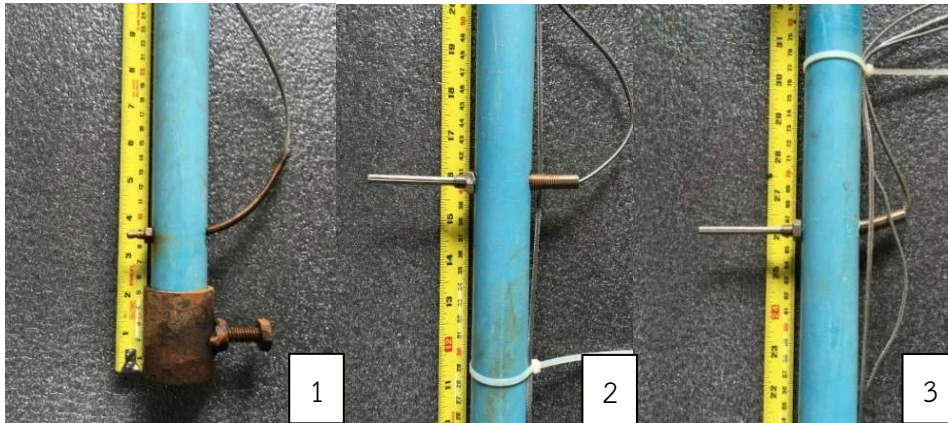
ภาพที่ 10 ตำแหน่งการวางเทอร์โมคัปเปิ้ลในการทดสอบ

ขั้นตอนที่ 2 ทดสอบเก็บอุณหภูมิในถังต้มโดยเก็บจำนวน 3 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 11 โดยการตั้งอุณหภูมิในตู้ควบคุมที่ 54°C โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ใส่น้ำให้เต็มถังต้ม

2. ทดสอบหาอุณหภูมิเครื่องให้ได้อุณหภูมิ 54°C โดยเก็บข้อมูลอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงทุกๆ 5 นาที

3. ใช้เครื่องวัดอุณหภูมิ 3 จุด ดังนี้



1) สูงจากก้นถึง 9 cm 2) สูงจากก้นถึง 40 cm 3) สูงจากก้นถึง 66 cm

ภาพที่ 11 ระยะการติดตั้งเทอร์โมคัปเปิ้ลเพื่อวัดอุณหภูมิ

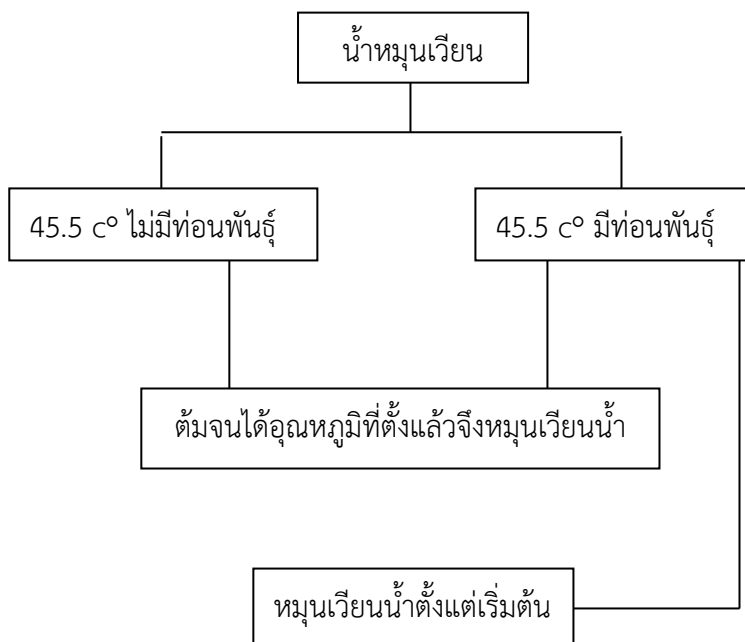
ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบเก็บอุณหภูมิในถังต้มโดยเก็บจำนวน 3 ตำแหน่ง ดังภาพที่ 12 โดยการปรับอุณหภูมิในตู้ควบคุมที่ 45.5°C



ภาพที่ 12 การวางสายเทอร์โมคัปเปิ้ลไว้ที่ปลายฮีตเตอร์

3.3.2 การทดสอบโดยการใช้ น้ำหมุนเวียนระหว่างถังต้มและถังแช่ท่อนพันธุ์

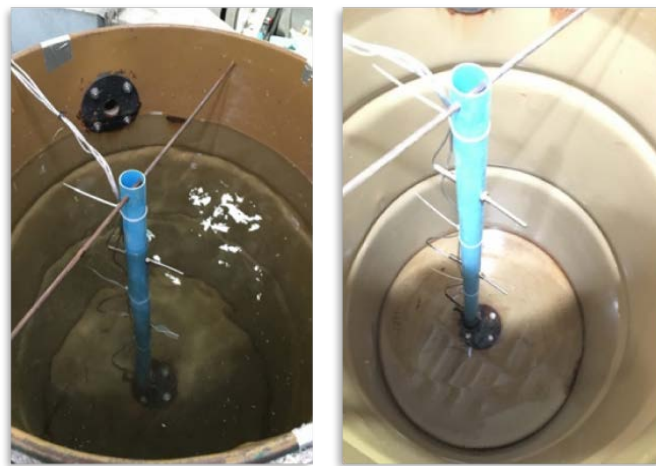
การทดสอบการใช้น้ำหมุนเวียนระหว่างถังต้มและถังแช่ท่อนพันธุ์แบ่งเป็น 3 การทดสอบ โดยจะเก็บอุณหภูมิ 3 ตำแหน่ง เช่นเดียวกับการทดสอบในถังต้ม แต่จะย้ายการติดตั้งเทอร์โมคัปเปิ้ล (ภาพที่ 13) ไปยังถังแช่ท่อนพันธุ์



ภาพที่ 13 แผนผังการทดสอบใช้น้ำหมวนเวียนระหว่างถังต้มและถังแช่ท่อนพันธุ์

การทดสอบที่ 1

- 1.ใส่น้ำให้เต็มถังต้มและถังแช่
- 2.ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ 45.5 C°เป็นเวลา 30 นาที
- 3.เมื่อครบ 30 นาทีเริ่มเปิดเครื่องสูบน้ำให้น้ำหมวนเวียนระหว่างถังต้มและถังแช่
- 4.บันทึกข้อมูลอุณหภูมิในถังแช่ทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 14 การเก็บข้อมูลอุณหภูมิในถังแช่

การทดลองที่ 2

- 1.ตัดอ้อยให้เป็นแบบข้อตาจำนวน 822 ท่อน (40.8 kg) แล้วใส่ลงไปถังแช่
- 2.เปิดน้ำใส่ถังต้มให้เต็มและใส่ถังแช่ (ประมาณ 190 ลิตร)
- 3.ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ 45.5 C°เป็นเวลา 30 นาที

- 4.เมื่อครบ 30 นาที เริ่มเปิดเครื่องสูบน้ำให้หมันเวียนระหว่างถังต้มน้ำและถังแช่
- 5.เก็บอุณหภูมิในถังแช่ทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 15 การเก็บข้อมูลอุณหภูมิถังแช่แบบมีข้อต้ออย

การทดสอบที่ 3

- 1.ตัดอ้อยให้เป็นแบบข้อตามปริมาณที่กำหนดแล้วใส่ไปในถังแช่
- 2.เปิดน้ำใส่ถังต้มน้ำให้เต็มและใส่ถังแช่ให้ถึงบริเวณที่กำหนดไว้
- 3.ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ 45.5 °C และเปิดเครื่องสูบน้ำให้ทำงานพร้อมกันตั้งแต่เริ่มต้น
- 4.เก็บอุณหภูมิในถังแช่ทุกๆ 5 นาที

3.4 การศึกษาการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP)

3.4.1 การศึกษาผลของ hot water treatment ในห้องปฏิบัติการ

3.4.1.1 ผลของ hot water treatment ต่อความงอกของข้อต้ออย

นำอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาตัดแบ่งออกเป็นท่อนจำนวน 12 ท่อน ต่อกรรมวิธี ยาวท่อนละประมาณ 7 เซนติเมตร นำท่อนพันธุ์มาแช่ลงในน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างกันทั้งหมด 6 treatment ดังนี้ T1= 50 °C 2 hr, T2= 52°C 1 hr, T3 = 54°C 10 min, T4 = 54°C 20 min, T5= 54°C 30 min และ T6= Control, RT 30 min เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำท่อนพันธุ์อ้อยขึ้น ผึ่งให้แห้งและเย็นลง จากนั้นนำมาปลูกลงในดินที่เตรียมไว้ในโรงเรือน โดยเตรียมดินใส่ถุงขนาด 6x10 เซนติเมตรโดยใช้ดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่มเก็บไว้ในโรงเรือน บันทึกผลโดยนับต้นที่งอก

3.4.1.2 ผลของ tetracycline treatment ที่ความเข้มข้น และเวลาในการแช่ต่อความงอกของข้อต้ออย

นำอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาตัดแบ่งออกเป็นท่อนจำนวน 3 ท่อนต่อกรรมวิธี ยาวท่อนละประมาณ 7 เซนติเมตรนำท่อนพันธุ์มาแช่ลงในน้ำที่มี tetracycline, อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ กัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่ tetracycline HCl 250 ppm 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่ tetracycline HCl 250 ppm 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ tetracycline HCl 500 ppm 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่ tetracycline HCl 500 ppm 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่น้ำ 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 6 แช่น้ำ 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 7 แช่ tetracycline HCl 250 ppm, อุณหภูมิห้อง, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 8 แช่ tetracycline HCl 250 ppm, อุณหภูมิห้อง, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 9 แช่ tetracycline HCl 500 ppm, อุณหภูมิห้อง, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 10 แช่ tetracycline HCl 500 ppm, อุณหภูมิห้อง, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 11 แช่น้ำอุณหภูมิห้อง, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 12 แช่น้ำอุณหภูมิห้อง, 30 นาที

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำท่อนพันธุ์อ้อยขึ้น ผึ่งให้แห้งและเย็นลง จากนั้นนำมาปลูกลงในดินที่เตรียมไว้ในโรงเรือน โดยเตรียมดินใส่ถุงขนาด 6×10 เซนติเมตร โดยใช้ดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่มวางไว้ในโรงเรือน บันทึกผลทุกๆ 7 วัน

3.4.1.3 ผลของ hot tetracycline treatment ต่อความงอกตาในตำแหน่งต่างๆ ของท่อนพันธุ์อ้อย

นำอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาตัดแบ่งออกเป็นท่อนๆ ละ 1 ตา โดยแยกตาออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ตาส่วนยอด ตาส่วนกลาง ตาส่วนโคน นำข้อตาส่วนต่างๆ ที่ตัดมาแช่ในกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 15 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 30 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่น้ำ 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่น้ำ 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 6 แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 7 แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 8 แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 9 ไม่แช่น้ำ



ภาพที่ 16 ลักษณะของส่วนตาต่างๆ ในท่อนพันธุ์

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำท่อนพันธุ์อ้อยขึ้น ผึ่งให้แห้งและเย็นลง จากนั้นนำมาปลูกลงในดินที่เตรียมไว้ในโรงเรือน โดยเตรียมดินใส่ถุงขนาด 6×10 เซนติเมตร โดยใช้ดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่มเก็บไว้ในโรงเรือนบันทึกความงอกของข้อตาอ้อย

3.4.1.4 ผลของ hot tetracycline treatment ต่อการควบคุมโรคใบขาวในข้อตาอ้อย

นำอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มาตัดแบ่งออกเป็นท่อนจำนวน 3 ท่อน ต่อกรรมวิธี ยาวท่อนละประมาณ 7 เซนติเมตรนำท่อนพันธุ์มาแช่ลงในน้ำที่มี tetracycline, อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ กัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่น้ำ 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 2 แช่น้ำ 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 3 แช่ tetracycline HCl 250 ppm 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 4 แช่ tetracycline HCl 250 ppm 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 5 แช่ tetracycline HCl 500 ppm 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 6 แช่ tetracycline HCl 500 ppm 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 7 แช่ สาร phyhtio 250 ppm 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 8 แช่ สาร phyhtio 250 ppm 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 9 แช่ สาร phyhtio 500 ppm 54 °C, 15 นาที

กรรมวิธีที่ 10 แช่ สาร phyhtio 500 ppm 54 °C, 30 นาที

กรรมวิธีที่ 11 แช่น้ำอุณหภูมิห้อง, 15 นาที

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำท่อนพันธุ์อ้อยขึ้น ผึ่งให้แห้งและเย็นลง จากนั้นนำมาปลูกลงในดินที่เตรียมไว้ในโรงเรือน โดยเตรียมดินใส่ถุงขนาด 6×10 เซนติเมตร โดยใช้ดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว รดน้ำให้ชุ่มวางไว้ในโรงเรือนเมื่อต้นกล้าอายุ 3 สัปดาห์ นำไปตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค Conventional PCR

3.4.2 การทดสอบการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP) ในแปลงปลูกทดลอง

ทำการทดลองระบบการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีต (Neo-Intensive Practice, NIP) โดยเริ่มต้นจากการผลิตต้นกล้าอ้อยที่ทำการฆ่าเชื้อโรคใบขาวโดยการแช่ใน tetracyclin HCl 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที นำไปเพาะในโรงเรือนกันแมลงเป็นเวลา 1 เดือน หลังจากนั้นนำกล้าอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงปลูกแปลงทดลองตามกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ต้นกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยซีไคอัดเม็ด+ปุ๋ยสั่งตัด

กรรมวิธีที่ 2 ต้นกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน

กรรมวิธีที่ 3 ต้นกล้าไม่แช่ยา, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยซีไคอัดเม็ด+ปุ๋ยสั่งตัด

กรรมวิธีที่ 4 ต้นกล้าไม่แช่ยา, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน

กรรมวิธีที่ 5 ต้นกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน

กรรมวิธีที่ 6 ต้นกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยซีไคอัดเม็ด+ปุ๋ยสั่งตัด

กรรมวิธีที่ 7 ต้นกล้าไม่แช่ยา, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน

กรรมวิธีที่ 8 ต้นกล้าไม่แช่ยา, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยซีไคอัดเม็ด+ปุ๋ยสั่งตัด

วางแผนงานทดลองแบบ split-split plot in RCB (4 ซ้ำ)

ขนาดแปลง: 4 แถว x 8 ม. (41.6 ม²); Plant spacing: 1.3 ม.; ระยะห่างระหว่างต้น 50 ซม.

Main Plot: Seedling (SL)

SL1 = ปลุกโดยท่อนพันธุ์ที่ไม่แช่

SL2 = ปลุกโดยต้นกล้าที่ผ่านการแช่ท่อนพันธุ์ด้วย tetracyclin HCl 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที

Subplot: Insect management (Ins)

Ins1 = ไม่ป้องกันแมลงพาหะ

Ins2 = ใส่สารป้องกันกำจัดแมลงพาหะ benfuracarb 3% GR (อัตรา 8 kg/rai)

Sub-subplot: Fertilizer management (Fer)

Fer1 = ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน

Fer2 = ใส่ปุ๋ยอินทรีย์+ปุ๋ยสังเคราะห์ (ปุ๋ยเคมีตามค่าวิเคราะห์)

1 เดือน = ปุ๋ยขี้ไก่อัดเม็ด (250 kg/rai) + 46-0-0 (2kg/rai) + 18-46-0 (13kg/rai) + 0-0-60 (20kg/rai)

3 เดือน = ปุ๋ยขี้ไก่อัดเม็ด (250 kg/rai) + 46-0-0 (2kg/rai) + 18-46-0 (13kg/rai) + 0-0-60 (20kg/rai)

การตรวจสอบการติดเชื้อโรคใบขาวในแปลงปลูก

สำรวจอาการโรคใบขาวอ้อยในแปลงปลูก จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 (อ้อยอายุ 4 เดือน) ในเดือนมีนาคม 2560 และครั้งที่ 2 (อ้อยอายุ 6 เดือน) ในเดือนพฤษภาคม 2560 และสุ่มเก็บตัวอย่างมาตรวจโรคในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค Conventional PCR ดังที่อธิบายไว้ข้างต้น โดยครั้งที่ 1 สุ่มเก็บแบบเดินทแยง ในแต่ละ block เก็บแถวละ 1 กอ จำนวนทั้งสิ้น $4 \times 32 = 128$ ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างที่เป็นแนวกัน (barrier) ด้วย สำหรับลักษณะอาการและสุ่มเก็บตัวอย่างอ้อยครั้งที่ 2 เมื่ออายุ 6 เดือน โดยสุ่มกรรมวิธีละ 1 ตัวอย่าง จำนวนทั้งสิ้น 32 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างที่เป็นแนวกัน (barrier) ด้วย

การเก็บตัวอย่างแมลงพาหะในแปลงปลูก

ทำการติดตามการระบาดของแมลงพาหะในแปลงปลูกโดยใช้การเก็บแมลง 2 รูปแบบ ได้แก่ กับดักกาวเหนียวสีน้ำเงิน (blue sticky trap) ขนาด 21 x 29 ซม. และ กับดักแสงไฟ (Light trap)



ภาพที่ 17 กับดักกาวเหนียวสีน้ำเงิน (blue sticky trap) และ กับดักแสงไฟ (light trap)

3.5 การอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยยาปฏิชีวนะร้อน

ทำการอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยการแช่ใน tetracyclin HCl 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที ให้กับเกษตรกรที่ปลูกอ้อย

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน การฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีจะมี การบรรยาย การสาธิต การฝึกปฏิบัติ และการแจกเอกสารเผยแพร่ ซึ่งหัวข้อในการฝึกอบรมประกอบด้วย

หัวข้อบรรยาย:

- ปัญหาโรคใบขาวของอ้อย: สถานการณ์ ผลกระทบ ต่อการผลิตอ้อยในปัจจุบัน
- หลักการและเทคนิคการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยในยาปฏิชีวนะร้อนเพื่อกำจัดโรคใบขาว
- การปฏิบัติในการดูแลกล้าพันธุ์และการเตรียมแปลงปลูก

ปฏิบัติการ:

- การคัดเลือกท่อนพันธุ์อ้อยในการแช่ท่อนพันธุ์
- การแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยยาปฏิชีวนะร้อนเพื่อกำจัดโรคใบขาว

บทที่ 4
ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาผลกระทบของโรคใบขาวที่ความรุนแรงต่างๆต่อความหวานอ้อยและรายได้

4.1.1 การสำรวจความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ในแปลงปลูกพื้นที่ อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม



ภาพที่ 18 ภาพการสำรวจโรคใบขาวในแปลงปลูกเกษตรกรใน อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

ผลการสำรวจระดับความรุนแรงโรคใบขาวอ้อยในแปลงปลูกเกษตรกร



ระดับ 5 4 3 2 1

ภาพที่ 19 ภาพระดับความรุนแรงของโรคใบขาวของอ้อยจากการสำรวจ

ตารางที่ 1 การแบ่งระดับความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยและลักษณะอาการ

ความรุนแรง	Rating scale	ลักษณะอาการ
รุนแรงมาก	5	ต้นมีข้อปล้องสั้นไม่ยืดยาว มีความสูงประมาณ 20-25% ของต้นปกติ ใบซีดขาวและแตกเป็นฝอยขนาดเล็กๆ จำนวนมาก
รุนแรง	4	ต้นมีข้อปล้องสั้น มีความสูงประมาณ 50-75% ของต้นปกติ ใบซีดขาวและแตกเป็นฝอยขนาดเล็กๆ
ปานกลาง	3	ต้นมีข้อปล้องสั้น มีความสูงประมาณ 50-75% ของต้นปกติ ใบซีดขาว
ไม่รุนแรง	2	ต้นอ้อยข้อปล้องยาวปกติ ใบซีดขาว
ไม่มีอาการโรค	1	ต้นอ้อยข้อปล้องยาวปกติ ไม่มีอาการโรคใบขาว

1.2 ผลการสำรวจค่าความหวาน (%Brix) ของอ้อยกับระดับความรุนแรงของโรคใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ K92-80

ตารางที่ 2 อ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 อายุ 15 เดือน บ.โนนทัน ต.วังยาว อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

ระดับความรุนแรงโรคใบขาว	ค่าความหวาน (%Brix) ของท่อนที่													ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
ไม่มีอาการ (1)	ND													
ไม่รุนแรง (2)	20.2	22.4	23.2	20.2	21.8	22.0	21.4	20.0	22.4	21.8	22.0	-	-	21.58
ปานกลาง (3)	17.2	19.2	19.0	16.8	16.4	20.0	20.0	16.8	17.6	19.6	18.4	-	-	18.27
รุนแรง (4)	11.0	14.2	10.6	5.0	9.0	9.2	14.0	11.0	5.8	7.4	11.0	6.8	-	9.58
รุนแรงมาก (5)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	0.0

ND = not determine

ตารางที่ 3 อ้อยพันธุ์ ขอนแก่น 3 อายุ 15 เดือน บ.หนองไร่ ต.วังยาว อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

ระดับความรุนแรงโรคใบขาว	ค่าความหวาน (%Brix) ของท่อนที่													ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
ไม่มีอาการ (1)	ND													
ไม่รุนแรง (2)	22.0	21.0	21.0	22.2	20.4	21.0	20.4	21.0	21.8	21.8	-	-	-	21.26
ปานกลาง (3)	17.0	18.0	15.4	14.0	15.8	15.4	14.8	13.8	18.0	14.8	17.0	-	-	15.82
รุนแรง (4)	17.0	15.0	15.8	18.0	8.0	11.0	17.6	16.6	11.6	14.2	8.0	4.0	-	13.07
รุนแรงมาก (5)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	0.0

ND = not determine

ตารางที่ 4 อ้อยพันธุ์ K92-80 อายุ 14 เดือน บ.ทิพโส ต.ดอนกลาง อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

ระดับความรุนแรงโรคใบขาว	ค่าความหวาน (%Brix) ของท่อนที่													ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
ไม่มีอาการ (1)	ND													
ไม่รุนแรง (2)	21.6	20.0	20.0	19.6	20.0	20.2	19.8	18.0	17.0	18.8	19.2	-	-	19.47
ปานกลาง (3)	17.6	17.2	19.0	17.4	17.6	17.0	17.0	16.0	-	-	-	-	-	17.35
รุนแรง (4)	9.0	5.0	7.8	6.8	3.8	2.4	9.0	9.0	7.0	11.6	11.0	-	-	7.49
รุนแรงมาก (5)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0

ND = not determine

ตารางที่ 5 อ้อยพันธุ์ K92-80 อายุ 14 เดือน บ.หนองไไร่ ต.วังยาว อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม

ระดับความ รุนแรงโรคใบ ขาว	ค่าความหวาน (%Brix) ของท่อนที่													ค่าเฉลี่ย
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
ไม่มีอาการ (1)	ND													
ไม่รุนแรง (2)	22.0	20.8	20.0	21.8	21.8	22.0	18.0	19.8	18.8	23.0	20.2	19.8	19.8	20.60
ปานกลาง (3)	16.8	17.2	17.2	18.0	15.0	12.0	12.8	-	-	-	-	-	-	15.57
รุนแรง (4)	4.0	4.0	4.0	7.0	7.0	6.8	3.0	4.0	4.0	7.2	2.8	3.8	-	4.80
รุนแรงมาก (5)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	0.0

ND = not determine

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ของค่าความหวาน (%Brix) กับระดับความรุนแรงของโรคใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ K92-80

ระดับความ รุนแรงโรคใบ ขาว	ค่าความหวาน (%Brix) ของพันธุ์ขอนแก่น 3			ค่าความหวาน (%Brix) ของพันธุ์K92-80		
	แปลงที่ 1	แปลงที่ 2	ค่าเฉลี่ย	แปลงที่ 1	แปลงที่ 2	ค่าเฉลี่ย
ไม่รุนแรง (2)	21.58	21.26	21.42	19.47	20.6	20.04
ปานกลาง (3)	18.27	15.82	17.05	17.35	15.57	16.46
รุนแรง (4)	9.58	13.07	11.33	7.49	4.8	6.15
รุนแรงมาก (5)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 7 ค่าความหวานอ้อย (%Brix และ commercial cane sugar, %CCS) กับระดับความรุนแรงของโรคใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ K92-80

พันธุ์อ้อย	ระดับความรุนแรง	Rep	%Brix	ค่าเฉลี่ย	CCS	ค่าเฉลี่ย	Pol	Purity
K92-80	รุนแรง (4)	4R1	11.84		*		3.54	29.89
		4R2	15.77		2.12		7.12	45.14
		4R3	11.04		0.39		4.09	37.04
		4R4	10.16	12.20	*	1.26	1.54	15.15
	ปานกลาง (3)	3R1	17.1		6.97		11.55	67.54
		3R2	19.03		6.25		11.62	61.06
		3R3	18.88		6.37		11.67	61.81
		3R4	15.8	17.70	6.22	6.45	10.49	66.39
	ไม่รุนแรง (2)	2R1	23.62		16.84		21.87	92.59
		2R2	22.54		15.64		20.52	91.03
		2R3	22.98		15.95		20.92	91.03
		2R4	22.91		15.9		20.86	91.05
		2R5	21.36	22.45	13.74	15.61	18.56	86.89
	ขอนแก่น 3	4R1	12.53		*		3.18	25.37
		4R2	19.1		2.73		8.76	45.86
		4R3	10.29		0.95		4.29	81.69
		4R4	14.54	14.12	1.53	1.74	6.22	42.77
	ปานกลาง (3)	3R1	17.0		1.57		7.09	41.7
		3R2	19.11		5.62		11.13	58.24

	3R3	21.01		1.81		8.66	41.21
	3R4	20.79	19.48	4.85	3.46	11.07	53.24
ไม่รุนแรง (2)	2R1	23.32		15.96		21.05	90.26
	2R2	23.29		16.54		21.51	92.35
	2R3	23.15		16.58		21.5	92.87
	2R4	23.36	23.28	16.89	16.49	21.82	93.4

*วัดค่าไม่ได้

ตารางที่ 8 การประเมินผลกระทบของระดับความรุนแรงโรคใบขาวอ้อยต่อรายได้ที่จะได้รับจากการขายอ้อยของเกษตรกร

พันธุ์	ระดับความรุนแรงโรคใบขาว	ค่าเฉลี่ย CCS	ค่า CCS ที่ลดลง (%)	ประมาณรายได้(บาท)/อ้อย(ตัน)*
K92-80	รุนแรงมาก (5)	0	100.00	0.00
	รุนแรง (4)	1.26	91.93	795.67
	ปานกลาง (3)	6.45	58.68	1,069.70
	ไม่รุนแรง (2)	15.61	0	1,553.35
พันธุ์	ระดับความรุนแรงโรคใบขาว	ค่าเฉลี่ย CCS	ค่า CCS ที่ลดลง (%)	ประมาณรายได้(บาท)/อ้อย(ตัน)*
KK3	รุนแรงมาก (5)	0	100.00	0.00
	รุนแรง (4)	1.74	89.45	821.01
	ปานกลาง (3)	3.46	79.02	911.83
	ไม่รุนแรง (2)	16.49	0	1,599.81

*อ้างอิงจาก ประกาศราคาอ้อยขึ้นต้น ปี 60/61 โดยคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย (กอน.)

ผลตอบแทนการผลิตและจำหน่ายน้ำตาลทรายขึ้นต้น คือ 377.14 บาท/ตัน

ราคาอ้อยขึ้นต่ำ 880 บาท/ตัน ที่ค่าความหวาน 10 CCS

อัตราขึ้น/ลงของราคาเท่ากับ 52.80 บาทต่อ 1 CCS

สรุปผลการทดลอง

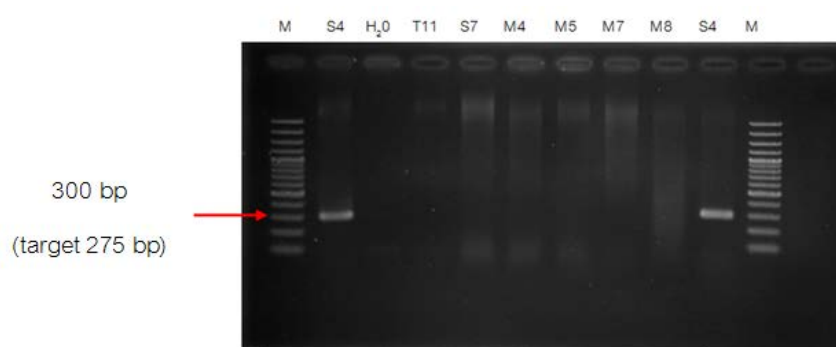
จากการสำรวจความรุนแรงของโรคใบขาวพบว่าสามารถแบ่งความรุนแรงของโรคใบขาวตามลักษณะอาการโรคที่แสดงออกได้ 5 กลุ่ม (ตารางที่ 1, ภาพที่ 19) ในการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับน้ำตาลในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ K92-80 กับระดับความรุนแรงของโรคใบขาวเมื่อวัดด้วยเครื่อง refractometer ในแปลงปลูกและทำการวิเคราะห์ความหวาน (CCS) พบว่ามีความสัมพันธ์กันในทิศทางที่สอดคล้องกันโดยเมื่อความรุนแรงโรคใบขาวรุนแรงมากขึ้นจะทำให้ค่า CCS ของอ้อยลดลงอย่างมาก โดยในต้นอ้อยที่มีระดับความรุนแรงมาก (5) จะไม่สามารถวัดค่า CCS ได้ เนื่องจากไม่มี plant sap ออกมาจากอ้อย อ้อยที่มีอาการโรคใบขาวปานกลาง (3) จะมีค่า CCS ลดลงตั้งแต่ 58.68-79.02% ส่วนอ้อยที่มีอาการโรครุนแรง (4) จะมีค่า CCS ลดลงตั้งแต่ 89.45-91.93% เมื่อเปรียบเทียบกับอ้อยที่มีอาการไม่รุนแรง (2) และถ้าประเมินเป็นรายได้ที่สูญเสียพบว่าอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่มีอาการรุนแรงจะทำให้รายได้ลดลง 483.65-757.68 บาท ในพันธุ์ K92-80 ส่วนในพันธุ์ขอนแก่น 3 ลดลง 687.98-778.80 บาทต่อต้นอ้อยเมื่อเทียบกับอ้อยที่มีอาการโรคใบขาวไม่รุนแรง

4.2 การพัฒนาเทคนิคตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย

4.2.1 การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Conventional PCR

ตัวอย่างต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

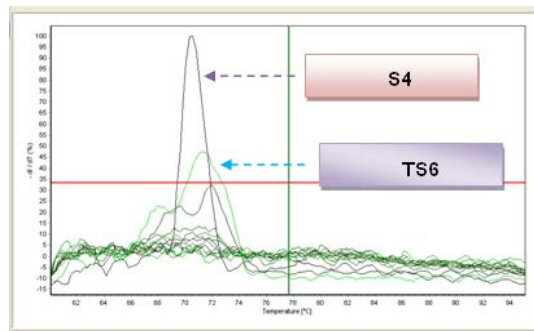
ตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยของตัวอย่างจากพันธุ์ขอนแก่น 3 ได้แก่ ตัวอย่าง M4, M5, M7 และ M8 ด้วยเทคนิค conventional PCR เปรียบเทียบกับตัวอย่าง S4 (positive control), H₂O (negative control), T11 (negative control) และ S7 คือ ตัวอย่างอ้อยที่นำมาเพาะไว้ในโรงเรือนด้วยเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ *secAfor* และ *secArev* พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 275 bp ได้แถบเดียว คือ ตัวอย่าง S4 ที่ใช้เป็น positive control ส่วนน้ำและตัวอย่าง T11, S7, M4, M5, M7 และ M8 ให้ผลเป็นลบ (ภาพที่ 20)



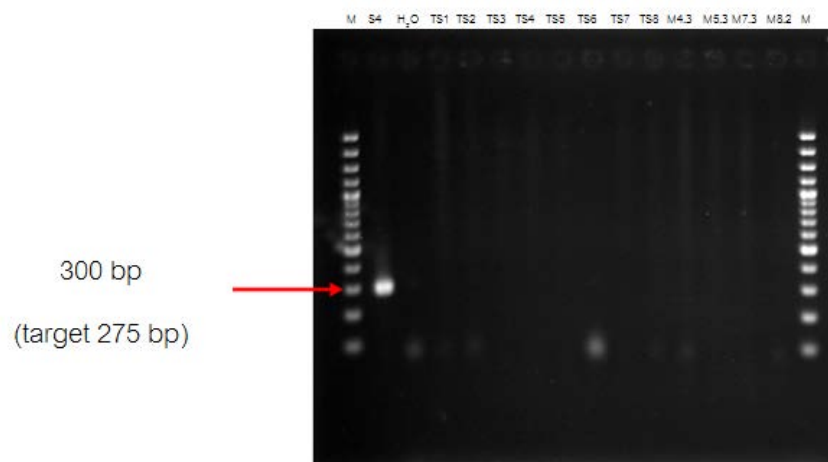
ภาพที่ 20 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor/secArev*; M = DNA ladder (Gene Ruler 100 bp plus), S4 = positive control, H₂O = negative control, T11 = ตัวอย่างอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลอดโรคใบขาว (negative control), S7 = ตัวอย่างอ้อยที่นำมาเพาะไว้ในโรงเรือน, M4, M5, M7 และ M8 = ตัวอย่างอ้อยขอนแก่น 3

4.2.2 การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Real-time PCR

ตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากตัวอย่างอ้อยที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี hot tetracycline treatment ได้แก่ TS1, TS2, TS3, TS4, TS5, TS6, TS7 และ TS8 จากอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ได้แก่ M4.3, M5.3, M7.3 และ M8.2 ตัวอย่าง S4 (positive control) และ H₂O (negative control) ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor/secArev* พบว่ามีเพียงตัวอย่าง S4 ที่ให้ผลเป็นบวก (ภาพที่ 21) เมื่อนำผลของปฏิกิริยา real-time PCR มาตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี gel electrophoresis เพื่อยืนยันผล พบว่าตัวอย่าง S4 (positive) control ให้ผลบวกเพียงตัวอย่างเดียวเช่นกัน (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 21 แสดงลักษณะ Melting curve จากปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secA*for/*secA*rev ในการตรวจสอบโรคใบขาวอ้อย พบเพียงตัวอย่าง S4 ที่แสดงผลเป็นบวก (positive)

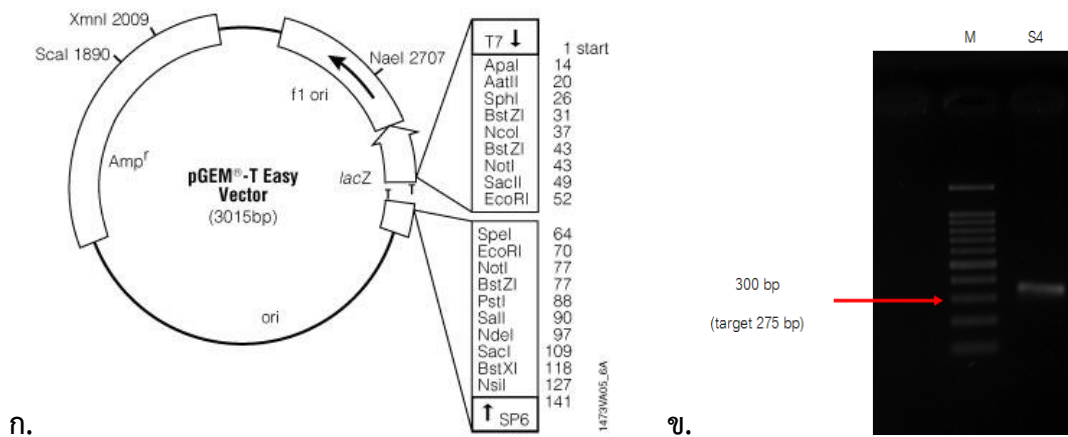


ภาพที่ 22 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค Real-time PCR เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธี gel electrophoresis; M = DNA ladder (Gene Ruler 100 bp plus), S4 = positive control, dH₂O = negative control, TS1-TS8 = อ้อยที่ผ่านกำจัดเชื้อด้วยวิธี hot tetracycline treatment, M4.3, M5.3, M7.3 และ M8.2 = อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

4.2.3 การหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค Real-time PCR

4.2.3.1 การโคลนยีน *secA*

จากการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) ของยีน *secA* ตัวอย่าง S4 มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วตรวจสอบคุณภาพ purified PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ได้ Purified PCR product ขนาด 275 bp (ภาพที่ 23ข) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) ภาพที่ 23ก เมื่อนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation พบว่าได้โคโลนีที่ต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 1 โคโลนี ซึ่งคาดว่าจะจะเป็น recombinant clone และนำมาตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

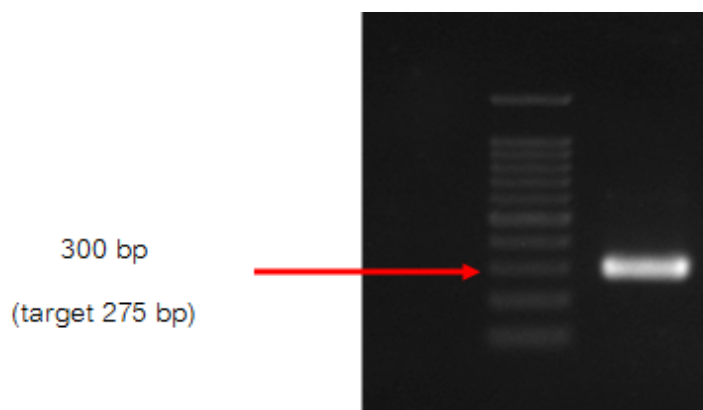


ภาพที่ 23 ก. ภาพโครงสร้างของพลาสมิด pGEM®- T Easy Vector (Promega, USA) ข. Purified PCR product ตัวอย่าง S4 ขนาด 275 bp ที่จะนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์

4.2.3.2 การตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

- การตรวจด้วยสอบด้วยวิธี colony PCR

จากการนำผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Easy vector เพื่อถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α และคัดเลือก recombinant clone ซึ่งเป็นโคลนีสขาวที่เจริญบนอาหาร 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินมาตรวจสอบการได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 275bp ได้ 1 แถบ

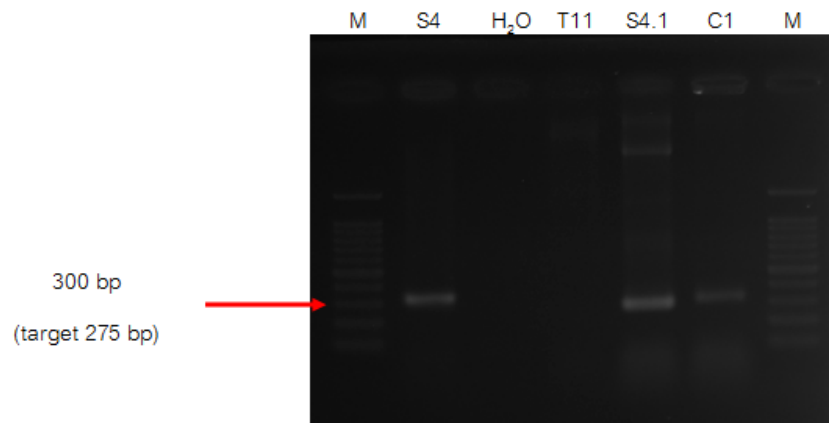


ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SecAfor/SecArev; lane1 = 100 bp DNA ladder, lane2 = ตัวอย่าง PG-S4 (*E. coli* SecA recombinant clone)

- การตรวจสอบด้วยวิธี conventional PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำแบคทีเรีย *E. coli* ที่ให้ผลบวกจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค colony PCR มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบการได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 275 bp ได้ 1 แถบ คือ ตัวอย่าง S4.1

(PG-S4) เทียบกับตัวอย่าง S4 ที่ใช้เป็น positive control และ C1 เป็นตัวอย่างที่ทำ colony PCR ส่วนตัวอย่างอื่นที่เป็น negative control ให้ผลลบ (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ผลการตรวจสอบพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor/secArev*

M = 100 bp DNA ladder

S4 = Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)

H₂O = Negative control

T11 = อ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

S4.1 = พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม (PG-S4)

C1 = โคโลนีตัวอย่าง PG-S4 (*E. coli secA* recombinant clone)

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SecA* ของตัวอย่าง S4 ที่เป็น recombinant clone (PG-S4 clone) และ blast ในฐานข้อมูล Genbank, NCBI พบว่าเหมือนยีน *SecA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการใบขาว strain KHO002 accession JX987221.1 99% เหมือนเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการกอดตะไคร้ (grassy shoot) strain SAK43, SAK12, AMN171, CHO085, SAK11, และ SPN_Co0238_Kamail 97% ดังตารางที่ 9 และกำลังอยู่ในการ submit ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเก็บไว้ในฐานข้อมูลของ Genbank, NCBI

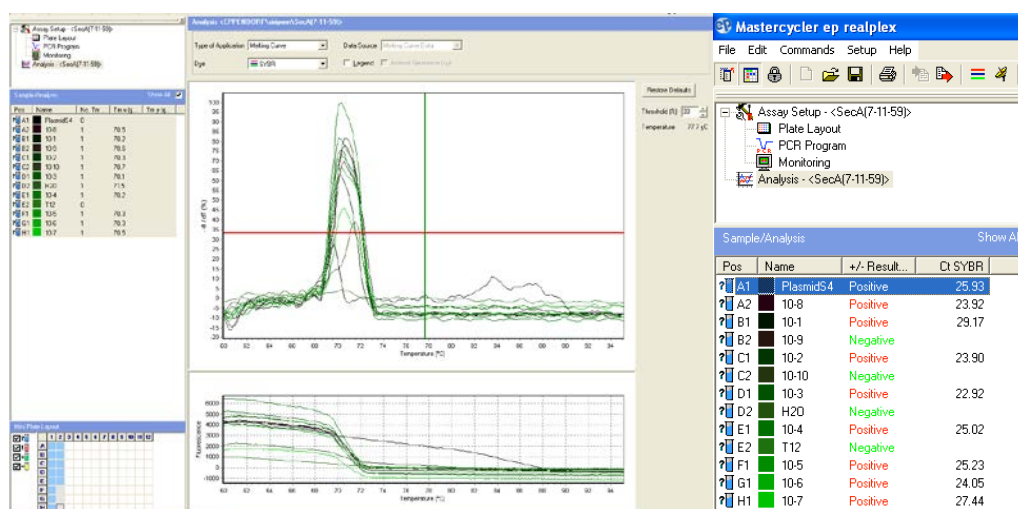
ตารางที่ 9 ผลของ nucleotide blast ของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาโรไบขาวอ้อย ตัวอย่าง S4 ที่เป็น recombinant clone (PG-S4 clone) เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาโรไบขาวอ้อยในฐานข้อมูล Genbank, NCBI

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Sugarcane white leaf phytoplasma strain KHO002 SecA gene, partial cds	490	490	100%	7e-135	99%	JX987241.1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma strain SAK43 SecA gene, partial cds	473	473	100%	7e-130	97%	JX987244.1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma strain SAK12 SecA gene, partial cds	473	473	100%	7e-130	97%	JX987243.1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma strain AMN171 SecA gene, partial cds	472	472	100%	3e-129	97%	JX987246.1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma strain CHO85 SecA gene, partial cds	468	468	100%	3e-128	97%	JX987245.1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma strain SAK11 SecA gene, partial cds	468	468	100%	3e-128	97%	JX987240.1
Sugarcane grassy shoot phytoplasma isolate SPN_Co0238_Karnal protein translocase subunit (secA) gene, partial cds	466	466	100%	1e-127	97%	KX215776.1

4.2.3.3 การหาความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR และ Conventional PCR โดยวิธีการเจือจางพลาสมิดสายผสม

- การหาความไวของปฏิกิริยา Real-time PCR

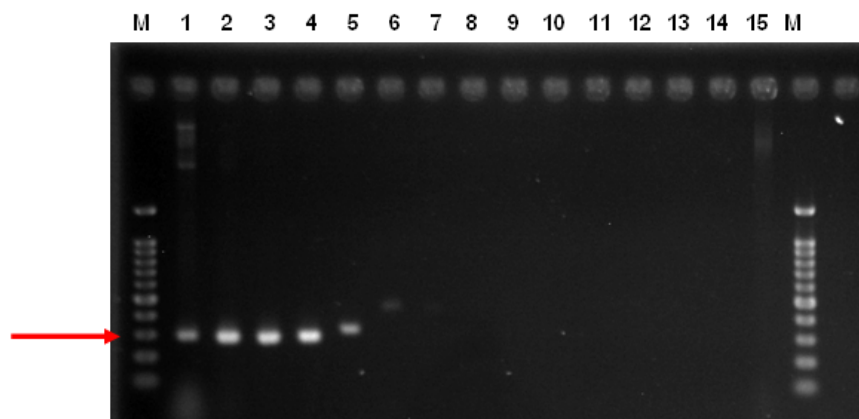
จากการเจือจางพลาสมิดสายผสมที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ 44.47 ng/μl ให้ความเข้มข้นระหว่าง 10^{-1} – 10^{-12} เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาความไวของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าการเจือจางระหว่าง 10^{-1} - 10^{-8} ให้ผลเป็นบวก นั่นคือ เทคนิค Real-time PCR ในการทดลองนี้สามารถตรวจสอบได้เมื่อเจือจางดีเอ็นเอ 100,000,000 เท่า หรือ 10^{-8} หรือสามารถตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อยที่สุด 4.47×10^{-8} pg ส่วนการเจือจางอื่นๆ รวมถึงน้ำและดีเอ็นเอจากอ้อยปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้เป็น Negative control ให้ผลเป็นลบ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 Melting curve จากปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secA* (ซ้าย) และค่า Ct value ของปฏิกิริยา (ขวา)

- การหาความไวของปฏิกิริยา conventional PCR

จากการเจือจางพลาสมิดสายผสมที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ 44.47 ng/ μ l ให้ได้ความเข้มข้นระหว่าง 10^{-1} – 10^{-12} เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาความไวของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค conventional PCR สามารถตรวจสอบได้เมื่อเจือจางดีเอ็นเอถึง 1,000,000 เท่า (10^{-6}) หรือสามารถตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อยที่สุด 4.47×10^{-6} pg ส่วนการเจือจางอื่นๆ รวมถึงน้ำและดีเอ็นเอจากอ้อยปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้เป็น negative control ให้ผลเป็นลบ (ภาพที่ 27)



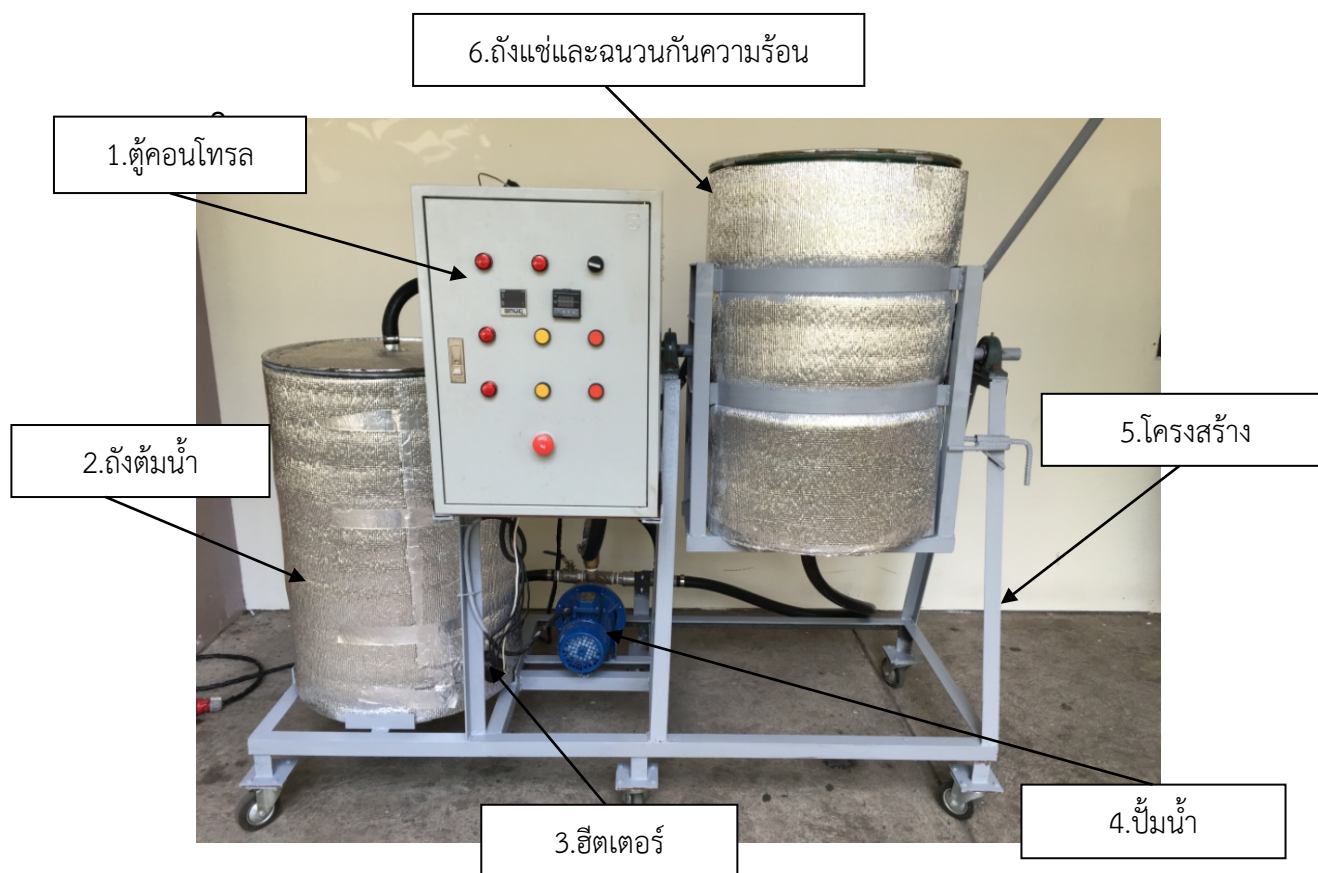
ภาพที่ 27 การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยาของเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor/secArev*: M = DNA Ladder 100 bp, 1-13 = พลาสมิดเจือจาง 10^{-1} – 10^{-12} ตามลำดับ, 14 = H₂O (Negative control), 15 = อ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Negative control)

สรุปผลการทดลอง

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไปใช้เทคนิค nested PCR ที่ตรวจเชื้อในตำแหน่ง 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมากเพราะใช้ปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง และมักมีปัญหาผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนและความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ ทำให้แปลผลยาก งานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ไพรเมอร์ในส่วนของยีน *secA* ซึ่งสามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค conventional PCR และ Real-time PCR โดยความไวของปฏิกิริยาด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าสามารถตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอเจือจางได้ถึง 1,000,000 เท่า (10^{-6}) หรือสามารถตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อยที่สุด 4.47×10^{-6} pg เทคนิค Real-time PCR ในการทดลองนี้สามารถตรวจสอบได้เมื่อเจือจางดีเอ็นเอ 100,000,000 เท่า (10^{-8}) หรือสามารถตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อยที่สุดเท่ากับ 4.47×10^{-8} pg

4.3 การพัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อย

4.3.1 การพัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 1 (ถังคู่)



ภาพที่ 28 เครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 1 (ถังคู่)

1. ตัวคอนโทรล มีหน้าที่ควบคุมฮีตเตอร์ให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นหรือลดลงโดยมีอุปกรณ์ควบคุมเวลา (timer) เป็นตัวควบคุมเวลาในการทำงานและใช้ในการควบคุมเครื่องสูบน้ำด้วย
2. ถังตม่น้ำ มีหน้าที่ใส่น้ำมีความจุน้ำได้ 200 ลิตร
3. ฮีตเตอร์ ขนาด 12,000 วัตต์ มีหน้าที่ให้ความร้อนน้ำให้ได้ตามอุณหภูมิที่ต้องการ
4. ปั้มน้ำ เป็นปั้มน้ำทนความร้อน ทนได้ 100 C° มีหน้าที่ในการเวียนน้ำในถังตม่น้ำไปยังถังแช่
5. โครงสร้างมีขนาดกว้าง 70 เซนติเมตร ยาว 180 เซนติเมตรสามารถวางถัง 200 ลิตรได้ 2 ถัง โครงสร้างยังสามารถรับน้ำหนักได้ 500 กิโลกรัม
6. ถังแช่และฉนวนกันความร้อนแบบมิกเซล หนา 1 เซนติเมตร มีวัสดุคือถัง 200 ลิตร สามารถบรรจุท่อนพันธุ์อ้อยแบบข้อตาได้ประมาณ 1,000 ข้อตา มีหน้าที่ในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยโดยใช้ระบบหมุนเวียนน้ำกับถังตม่น้ำ

ผลการทดสอบ

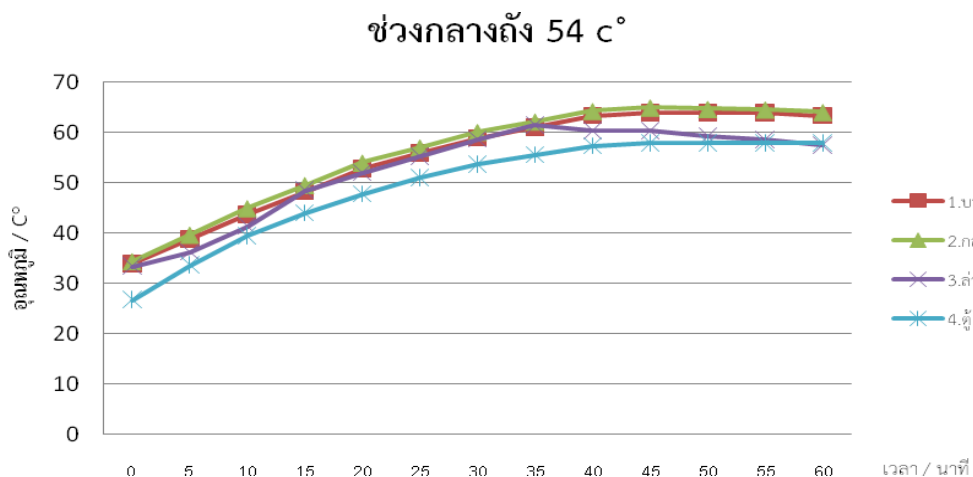
1 ผลการทดสอบอุปกรณ์แช่ท่อนพันธุ์โดยไม่ใช้ระบบน้ำหมุนเวียน

การทดสอบแบ่งผลเป็น 3 ขั้นตอนดังนี้

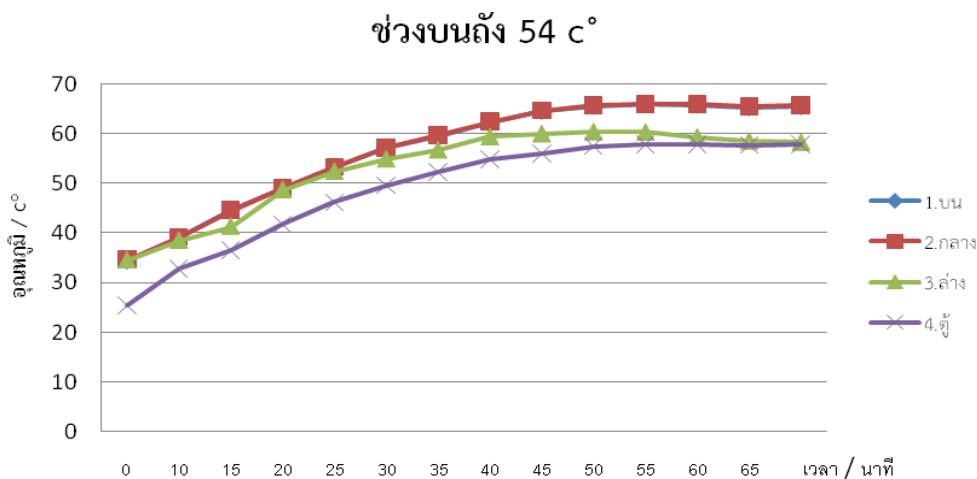
ผลการทดสอบขั้นตอนที่ 1 การทดสอบวางหัวเทอร์โมคัปเปิ้ล 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ช่วงกลางถัง ช่วงบนถังและช่วงปลายฮีตเตอร์ ดังแสดงในภาพดังที่ 29.1, 29.2 และ 29.3 ตามลำดับ พบว่า การทดสอบการวางหัว

เทอร์โมคัปเปิ้ลบริเวณกลางถึงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีความเสถียรมากที่สุด (ใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ปรับตั้งมากที่สุด) ทำให้อุปกรณ์เหล่านี้มีประสิทธิภาพในการใช้ตำแหน่งนี้ในการติดตั้งเทอร์โมคัปเปิ้ลในการทดสอบต่อไป

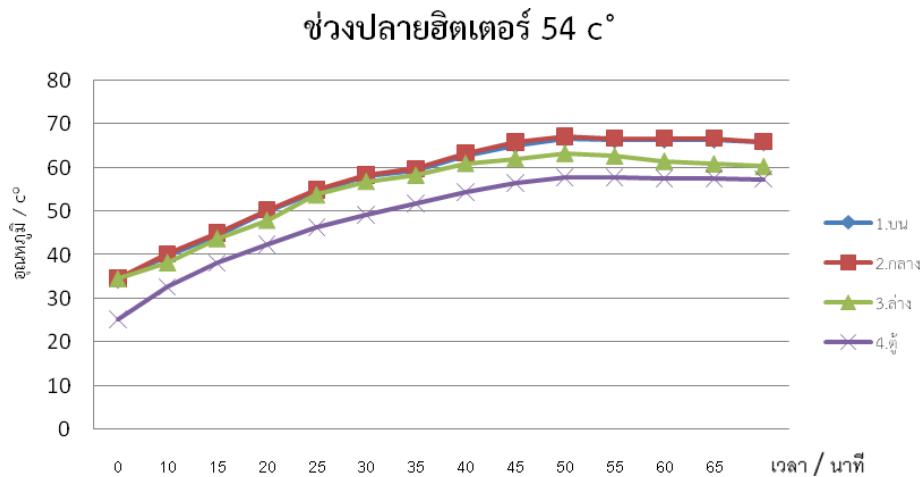
ผลการทดสอบขั้นตอนที่ 2 การเก็บอุณหภูมิในถังต้มโดยเก็บจำนวน 3 ตำแหน่ง โดยการตั้งอุณหภูมิไปในตู้คอนโทรลที่ 54 C° ผลการทดสอบดังภาพที่ 29.1, 29.2 และ 29.3 ตามลำดับอุณหภูมิในถังต้มที่เก็บได้จะอยู่ที่ประมาณ 65 C° อุณหภูมิสูงเกินกว่าที่ต้องการจึงจำเป็นต้องปรับตั้งอุณหภูมิใหม่ให้มีความเหมาะสม



ภาพที่ 29.1 ค่าของอุณหภูมิระดับกึ่งกลางถึง

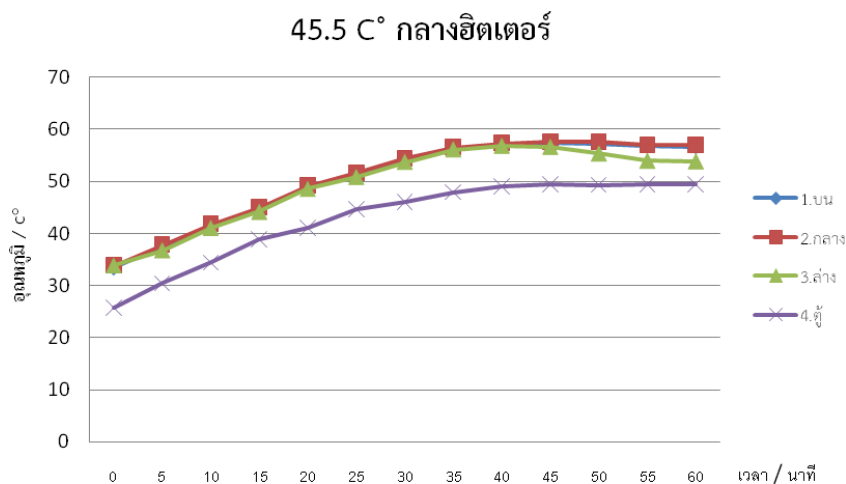


ภาพที่ 29.2 ค่าของอุณหภูมิตั้ง



ภาพที่ 29.3 ค่าของอุณหภูมิช่วงปลายฮีตเตอร์

ผลการทดสอบขั้นตอนที่ 3 การเก็บอุณหภูมิในถังต้มโดยเก็บจำนวน 3 จุด โดยการตั้งอุณหภูมิในตู้ควบคุมที่ 45.5 °C ผลการทดสอบดังภาพที่ 29.4 อุณหภูมิในถังต้มจะได้ 54 °C ที่ 30 นาทีและอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นทีละเล็กน้อยจนครบเวลาที่กำหนดอีก 30 นาที จนอุณหภูมิ 57 °C ในการทดสอบนี้ใช้เวลารวมทั้งตั้งแต่เริ่มต้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

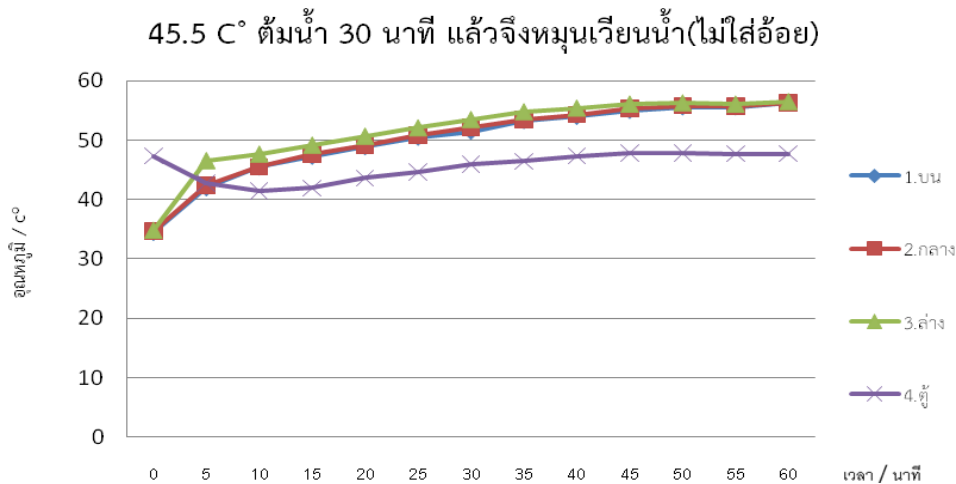


ภาพที่ 29.4 ค่าของอุณหภูมิกกลางฮีตเตอร์

2. ผลการทดสอบโดยใช้ระบบน้ำหมุนเวียน

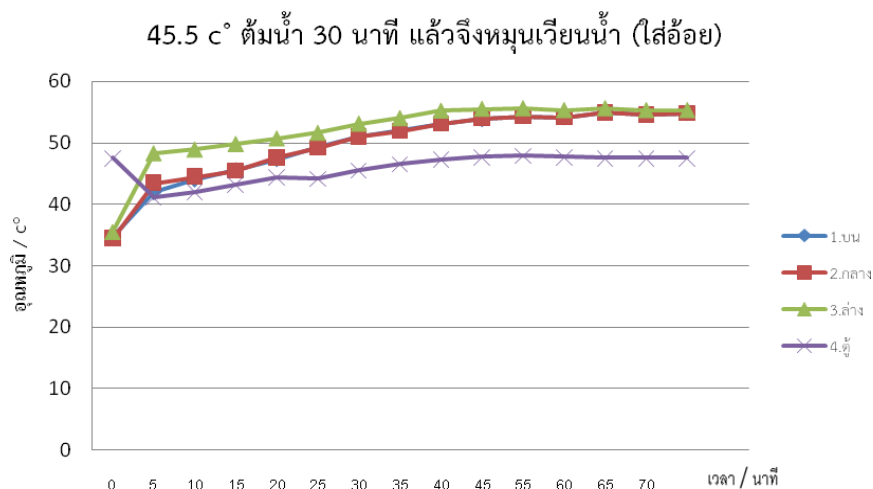
ผลการทดสอบแบบน้ำหมุนเวียนจะแบ่งเป็น 3 การทดสอบ โดยจะเก็บอุณหภูมิ 3 ตำแหน่ง เหมือนการทดลองในถังต้ม แต่จะติดตั้งเทอร์โมคัปเปิ้ลเพื่อวัดอุณหภูมิ 3 ตำแหน่ง ณ ถังแช่แทน

ผลการทดสอบที่การทดสอบที่ 1 (ปรับตั้งอุณหภูมิไปในตู้ควบคุมที่ 45.5 °C) ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 30.1 อุณหภูมิในถังแช่จะถึงอุณหภูมิที่ 54 °C ที่เวลา 35 นาที อุปกรณ์จะทำงานต่ออีก 30 นาทีตามเงื่อนไขที่กำหนดและอุณหภูมิจะคงที่สม่ำเสมอและจะเพิ่มขึ้นจนอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 56 °C



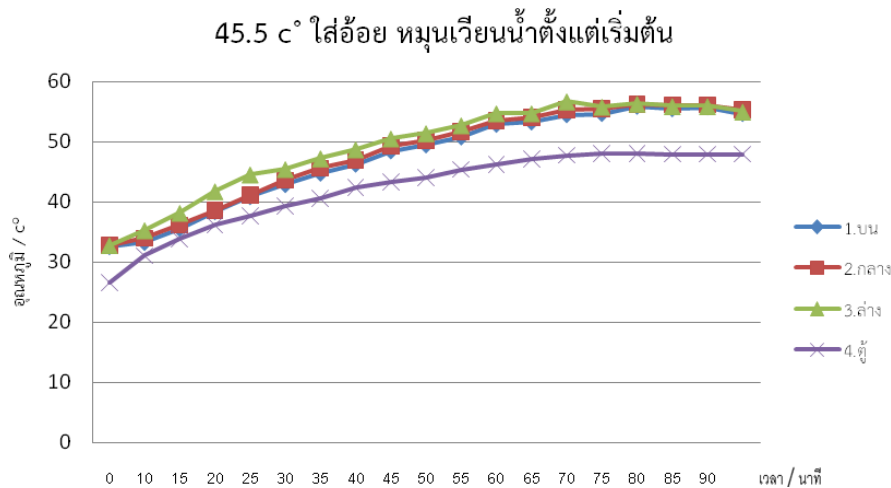
ภาพที่ 30.1 การตั้งอุณหภูมิที่ 45.5 C° นาน 30 นาที แล้วเปิดระบบหมุนเวียนน้ำ (แบบไม่ใส่ฮ้อย)

ผลการทดสอบการทดสอบที่ 2 ผลการทดสอบดังภาพที่ 30.2 โดยมีท่อนพันธุ์จำนวน 822 ท่อน (40.8 kg) โดยเปิดเครื่องก่อน 30 นาทีและทำการเปิดปั๊ม อุณหภูมิในถังแช่จะถึงอุณหภูมิที่ 54 C° ที่เวลา 40 นาทีเครื่องจะทำงานต่ออีก 30 นาทีตามเงื่อนไขกำหนดอุณหภูมิจะคงที่สม่ำเสมอไปจนอุณหภูมิจะขึ้นจนถึง 55 C° ในการทำงานของอุปกรณ์จะทำงานที่เวลารวมที่ 1 ชั่วโมง 40 นาที



ภาพที่ 30.2 การตั้งอุณหภูมิที่ 45.5 C° นาน 30 นาที แล้วเปิดระบบหมุนเวียนน้ำ (แบบใส่ฮ้อย)

ผลการทดสอบการทดสอบที่ 3 ผลการทดสอบดังภาพที่ 30.3 พบว่าอุณหภูมิในถังแช่จะถึงอุณหภูมิที่ 54 C° ที่เวลา 60 นาที อุปกรณ์จะทำงานต่ออีก 30 นาทีตามเงื่อนไขที่กำหนดอุณหภูมิจะสม่ำเสมอและจะเพิ่มขึ้นจนอุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 55 C° การทำงานของเครื่องใช้เวลารวม 1 ชั่วโมง 30 นาที



ภาพที่ 30.3 การตั้งอุณหภูมิที่ 45.5 °C ใส่้อยในถัง และเปิดหมุนเวียนน้ำตั้งแต่เริ่มต้น

สรุปผลการทดลอง

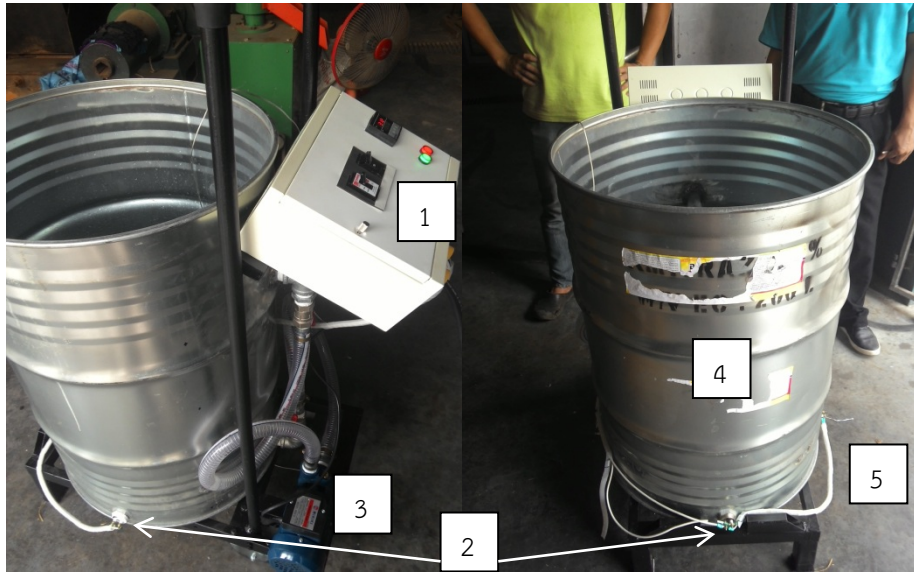
งานวิจัยนี้ได้พัฒนาและออกแบบเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบแยกถังต้มน้ำให้มีระบบควบคุมอุณหภูมิที่ดีตามเงื่อนไขที่กำหนด สามารถแช่ท่อนพันธุ์แบบข้อตาได้จำนวนประมาณ 1,000 ข้อตา/ครั้ง เครื่องสามารถทำอุณหภูมิได้ถึง 100 °C เพื่อต้ม tetracycline HCl ให้เสื่อมสภาพก่อนทำการกำจัดทิ้ง โดยเครื่องแช่ท่อนพันธุ์มีส่วนประกอบหลักได้แก่ 1.ตู้คอนโทรล 2.ถังต้มน้ำขนาด 200 ลิตร 3. ฮีตเตอร์ 4. เครื่องสูบน้ำ 5. โครงสร้างเครื่อง 6. ถังแช่ท่อนพันธุ์อ้อย ขนาด 200 ลิตร

ผลการทดสอบการวางตำแหน่งของเทอร์โมคัปเปิล 3 ตำแหน่งพบว่า จุดที่มีความเหมาะสม คือ ตรงกลางของฮีตเตอร์และต้องตั้งอุณหภูมิที่ตู้ควบคุมไว้ที่ 45.5 °C จึงจะทำให้อุณหภูมิภายในถังแช่มีค่าเท่ากับ 54 °C และผลของการทดสอบการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่อุณหภูมิ 54 °C นาน 30 นาที โดยมีการหมุนเวียนน้ำพบว่าเมื่อเปิดฮีตเตอร์ก่อน 30 นาที จะใช้เวลาแช่ท่อนพันธุ์อ้อยรวม 1 ชั่วโมง 40 นาทีและเมื่อเปิดฮีตเตอร์พร้อมกับหมุนเวียนน้ำตั้งแต่เริ่มต้น ใช้เวลารวมทั้งหมด 1 ชั่วโมง 30 นาทีในการต้มครั้งแรก แต่เมื่อทำการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่อุณหภูมิ 54 °C นาน 30 นาที ในรอบต่อไปจะใช้เวลาลดลง เหลือแค่ 40-45 นาทีต่อครั้ง

เนื่องด้วยเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยนี้มีระบบหมุนเวียนน้ำแยกถัง ทำให้ตัวเครื่องมีขนาดใหญ่ ส่งผลต่อการขนย้ายเพื่อนำไปใช้ในการทดลองในแปลงปลูกทดสอบ ทางคณะวิจัยฯ จึงได้ทำการพัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 2 ซึ่งถึงที่ทำการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยมีระบบหมุนเวียนน้ำในตัวเพื่อลดขนาดเครื่องทำให้สามารถเคลื่อนย้ายได้สะดวก

3.2 การพัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 2 (ถังเดียว)

ประกอบด้วยชิ้นส่วนหลักดังต่อไปนี้ 1) ชุดควบคุม ภายในประกอบด้วย ชุดควบคุมอุณหภูมิ ชุดควบคุมปั๊มน้ำ และอุปกรณ์แสดงผลอุณหภูมิ 2) ฮีตเตอร์ ขนาด 2,000 วัตต์ จำนวน 3 ตัว ติดตั้งในระดับเดียวกัน ทำมุมห่างกัน 120 องศา 3) ปั๊มน้ำขนาด 0.5 แรงม้า จำนวน 1 ตัว 4) ถังซุสแตนเลส ขนาด 200 ลิตร จำนวน 1 ถัง และ 5) โครงเครื่องมีล้อติดตั้งด้านล่าง สามารถเข็นเคลื่อนที่ได้โดยสะดวก (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 เครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 2 (ถังเดียว)

ต้นแบบอุปกรณ์แช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบเคลื่อนย้ายง่าย มีหลักการทำงานดังนี้

- 1) เปิดสวิทช์เครื่อง และปรับตั้งอุณหภูมิที่ต้องการ ฮีตเตอร์จะทำงานทั้ง 3 ตัว เพื่อเร่งให้ถึงอุณหภูมิที่กำหนดไว้อย่างรวดเร็ว
- 2) เปิดสวิทช์ปั้มน้ำ ปั้มน้ำจะทำการหมุนเวียนน้ำในถังแช่ (ภาพที่ 32) โดยดูดน้ำจากด้านบนเวียนลงมาด้านล่าง



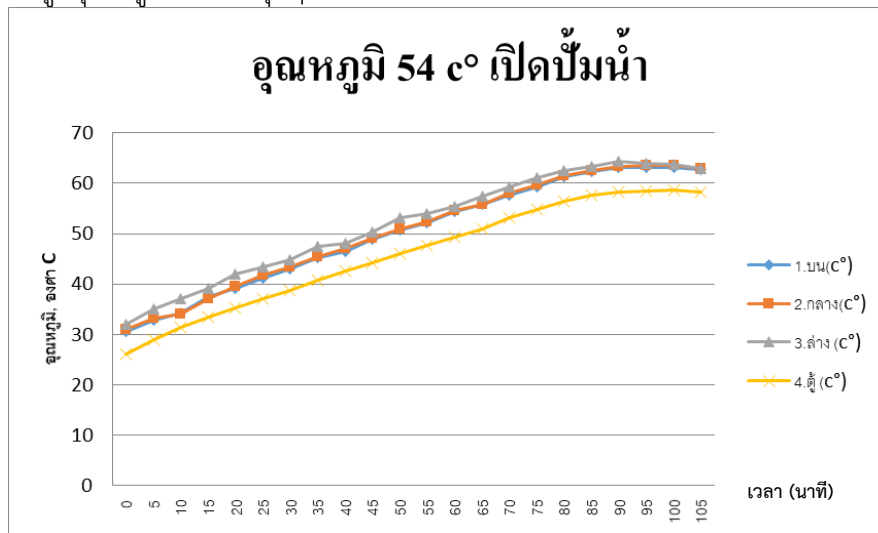
ภาพที่ 32 ระบบหมุนเวียนน้ำในถังแช่

- 3) เมื่ออุณหภูมิถึงค่าที่กำหนด ฮีตเตอร์ 2 ตัว จะถูกตัดการทำงาน เหลือเพียงหนึ่งตัวเพื่อคงอุณหภูมิที่ต้องการไว้ แล้วนำท่อนพันธุ์อ้อยลงแช่
- 4) เมื่อถึงเวลาที่กำหนดจึงนำท่อนพันธุ์อ้อยที่แช่ครบกำหนดขึ้นและนำท่อนพันธุ์อ้อยชุดใหม่แช่ต่อไป

ผลการทดสอบ

การทดสอบที่ 1: หาค่าการปรับตั้งฮีตเตอร์ที่เหมาะสม

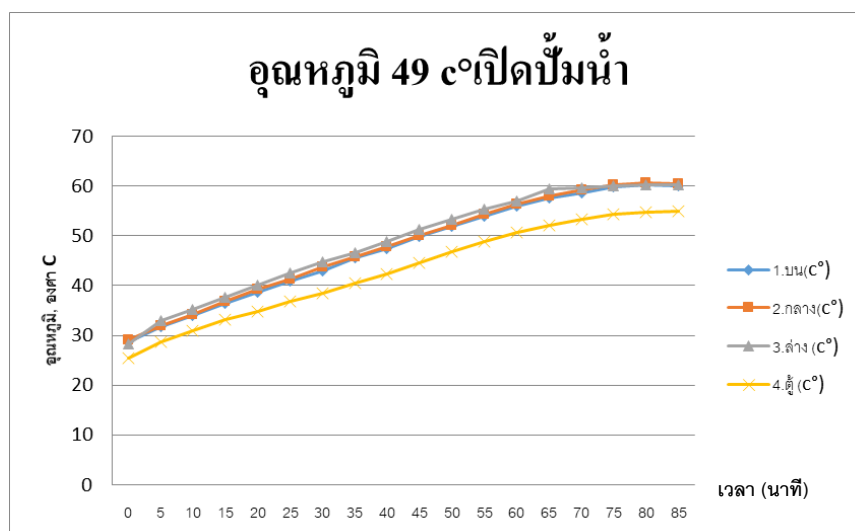
1. ใส่น้ำให้เต็มถัง
2. ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ $54\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. เปิดปั๊มสูบน้ำให้น้ำหมุนเวียนในถัง
4. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิในถังทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 33.1 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ $54\text{ }^{\circ}\text{C}$

การทดสอบที่ 2: หาค่าการปรับตั้งฮีตเตอร์ที่เหมาะสม

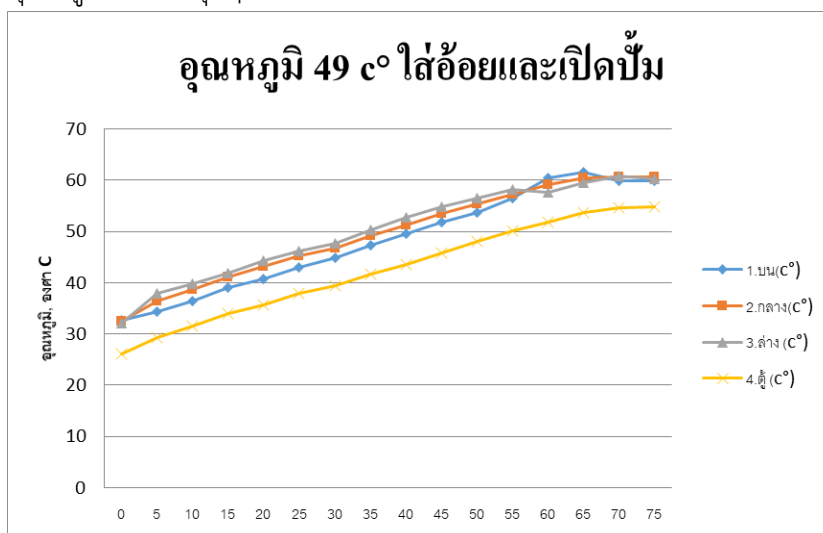
1. ใส่น้ำให้เต็มถัง
2. ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ $49\text{ }^{\circ}\text{C}$
3. เปิดปั๊มสูบน้ำให้น้ำหมุนเวียนในถัง
4. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิในถังทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 33.2 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 49 °C

การทดสอบที่ 3: หาค่าการปรับตั้งฮีตเตอร์ที่เหมาะสม โดยทดสอบพร้อมท่อนพันธ์อ้อย

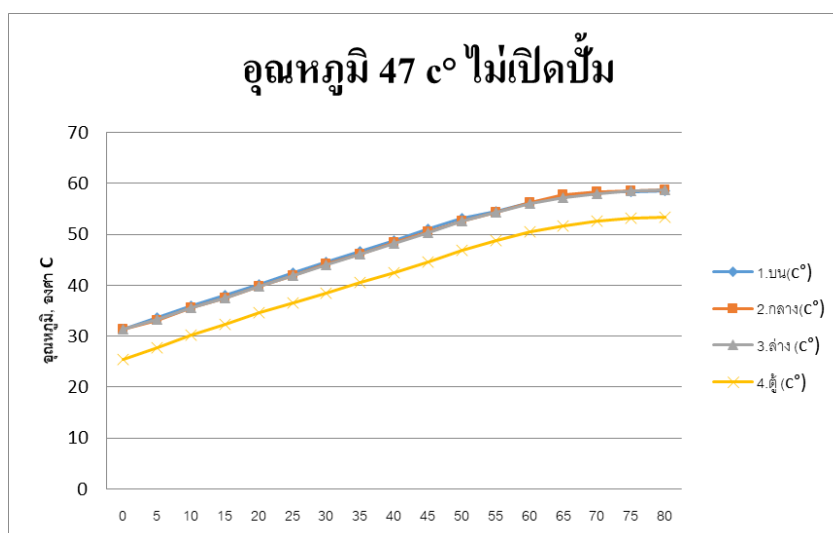
1. ใส่น้ำให้เต็มถัง
2. ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ 49 °C
3. ใส่อ้อยลงไปจนถึง จำนวน 1,000 ท่อน หรือ 80.8 กิโลกรัม
4. เปิดปั๊มสูบน้ำให้น้ำหมุนเวียนในถัง
5. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิในถังทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 33.3 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 49 °C และใส่อ้อย

การทดสอบที่ 4: หาค่าการปรับตั้งฮีตเตอร์ที่เหมาะสม โดยทดสอบพร้อมท่อนพันธ์อ้อยไม่เปิดปั๊มสูบน้ำ

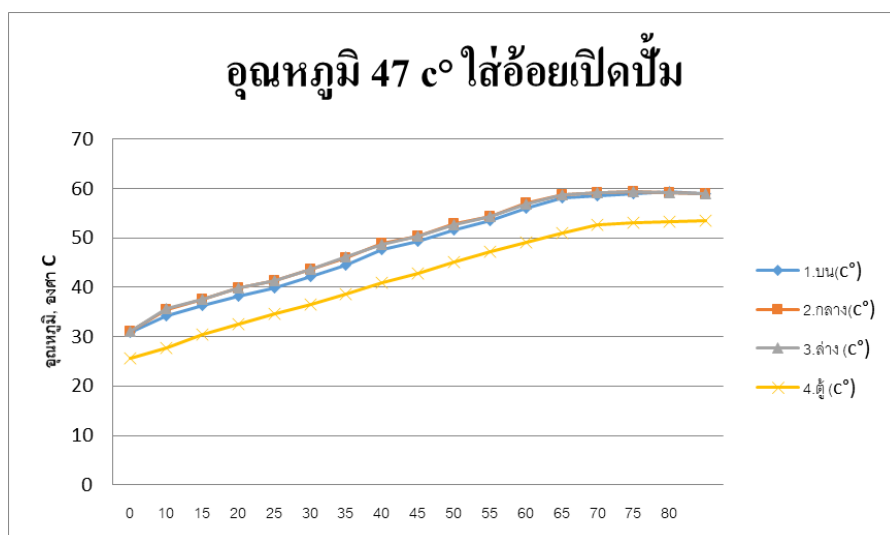
1. ใส่น้ำให้เต็มถัง
2. ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ 47 °C
3. ไม่เปิดปั๊มสูบน้ำให้น้ำหมุนเวียนในถัง
4. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิในถังทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 33.4 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งค่าฮีตเตอร์ไว้ที่ 47 °C และไม่เปิดระบบปั๊มน้ำ

การทดสอบที่ 5: หาค่าการปรับตั้งฮีตเตอร์ที่เหมาะสม โดยทดสอบพร้อมท่อนพันธู้อ้อย เปิดปั้มสูบน้ำ

1. ใส่น้ำให้เต็มถัง
2. ปรับตั้งอุณหภูมิฮีตเตอร์ไว้ที่ 47°C
3. ใส่อ้อยลงไปจนถึง จำนวน 1,000 ข้อตา หรือ 80.8 กิโลกรัม
4. เปิดปั้มสูบน้ำให้น้ำหมุนเวียนในถัง
5. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิในถังทุกๆ 5 นาที



ภาพที่ 33.5 ค่าของอุณหภูมิที่วัดได้เมื่อตั้งฮีตเตอร์ไว้ที่ 47°C และเปิดระบบปั้มน้ำ

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบการวางตำแหน่งของเทอร์โมคัปเปิล 3 ตำแหน่ง พบว่าต้องตั้งอุณหภูมิที่ตู้ควบคุมที่ 47°C จึงจะทำให้อุณหภูมิภายในถังแช่มีค่าเท่ากับ 54°C และอุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นจนถึง 59°C เนื่องจากฮีตเตอร์จะมีทำงานตลอดเวลา 1 ตัว ทำให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นในการใช้งานจะทำการปิดเครื่องเมื่อถึงอุณหภูมิที่ 54°C และเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 54°C จึงจะเปิดเครื่องอีกครั้ง และในการทดสอบระหว่างเปิดปั้มน้ำกับไม่เปิดปั้มน้ำมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนประสิทธิภาพในการแช่ท่อนพันธู้อ้อยสามารถทำได้ 1,000 ข้อตาต่อครั้ง โดยในการทำงานครั้งแรกของเครื่องใช้เวลาทั้งหมด 1 ชั่วโมง 20 นาที ต่อมาจะใช้เวลาลดลงเหลือครั้งละ 40-45 นาที ซึ่งเครื่องแช่ท่อนพันธู้อ้อยแบบที่ 2 นี้จะมีความสะดวกในการเคลื่อนย้ายและการทำงานมากกว่าเครื่องแช่ท่อนพันธู้อ้อยแบบที่ 1 และมีประสิทธิภาพในการทำงานเหมือนกัน

4.4 การศึกษาการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP)

4.4.1 การศึกษาผลของ hot water treatment ในห้องปฏิบัติการ

4.4.1.1 ผลของ hot water treatment ต่อความงอกของท่อนพันธุ์อ้อย

จากการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี hot water treatment ทั้ง 6 treatment โดยเพาะ treatment ละ 12 ต้น พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 ท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิ 50 °C 2 hr (T1) และ 52°C 1 hr (T2) งอกมากที่สุด คือ 6 ต้น รองลงมา คือ 54°C 10 min (T3) และ 54°C 20 min (T4) งอก 5 ต้น เท่ากัน รองลงมา คือ Control, RT 30 min (C6) งอก 3 ต้น และ 54°C 30 min (T5) งอกน้อยที่สุด คือ 2 ต้น ในสัปดาห์ที่ 2 ท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิ 50 °C 2 hr (T1) งอกเพิ่ม 3 ต้น ที่อุณหภูมิ 52°C 1 hr (T2), 54°C 10 min (T3) และ 54°C 20 min (T4) งอกเพิ่ม 5 ต้น ที่อุณหภูมิ 54°C 30 min (T5) งอกเพิ่ม 4 ต้น และที่อุณหภูมิ RT 30 min (T6) งอกเพิ่ม 6 ต้น ในสัปดาห์ที่ 3 ท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิ 54°C 10 min (T3) และ RT 30 min (C6) งอกเพิ่ม 1 ต้น ที่อุณหภูมิ 54°C 20 min (T4) งอกเพิ่ม 2 ต้น ที่อุณหภูมิ 54°C 30 min (T5) งอกเพิ่ม 4 ต้น สัปดาห์ที่ 4 ท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิ RT 30 min (T6) งอกเพิ่ม 1 ต้น สรุปจำนวนต้นที่งอกทั้งหมดของ T4 ที่อุณหภูมิ 54°C นาน 20 นาที งอกดีที่สุด คิดเป็น 100% ส่วน T2, T3 และ T6 งอกดีรองลงมา คิดเป็น 91.67% คิดเป็น ตามด้วย T5 คิดเป็น 83.33% และ T1 คิดเป็น 75% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot water treatment

สัปดาห์ที่	เปอร์เซ็นต์ความงอกของแต่ละกรรมวิธี					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	(50°C, 2 hr)	(52°C, 1 hr)	(54°C, 10min)	(54°C, 20min)	(54°C ,30min)	(RT, 30 min)
1	50.00	60.00	41.67	41.67	16.17	25.00
2	75.00	91.67	83.33	83.33	50.00	75.00
3	75.00	91.67	91.67	100.00	83.33	83.33
4	75.00	91.67	91.67	100.00	83.33	91.67

4.4.1.2 ผลของ tetracycline treatment ที่ต่อความงอกของท่อนพันธุ์อ้อย

จากการทดสอบเปอร์เซ็นต์การงอกของท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี hot tetracycline treatment ทั้ง 12 treatment พบว่าท่อนพันธุ์จะเริ่มงอกในสัปดาห์ที่ 2 โดยเมื่อเก็บผลการทดลองนาน 4 สัปดาห์ พบว่าท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิ 54 °C นาน 15 และ 30 นาที (T5,T6) จะมีความงอกมากที่สุด เท่ากับ 88.89% รองลงมาได้แก่ ท่อนพันธุ์ที่แช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที (T12), tetracycline 500ppm นาน 30 นาที (T10), น้ำ นาน 15 นาที (T11), tetracycline 250 ppm 54°C นาน 30 นาที (T2), tetracycline 500 ppm, 54°C นาน 30 นาที (T4), tetracycline 250 ppm นาน 15 นาที (T7), tetracycline 250 ppm 54°C นาน 15 นาที (T1), tetracycline 500 ppm 54°C นาน 15 นาที (T3), tetracycline 250 ppm, นาน 30 นาที (T8) ซึ่งมีความงอกเท่ากับ 66.67, 44.44, 44.44, 33.33, 33.33, 33.33, 11.11, 11.11 และ 11.11% ตามลำดับ โดยที่ท่อนพันธุ์ที่แช่ใน tetracycline 500 ppm นาน 15 นาที (T9) ไม่พบท่อนพันธุ์งอกเลย (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot tetracycline treatment

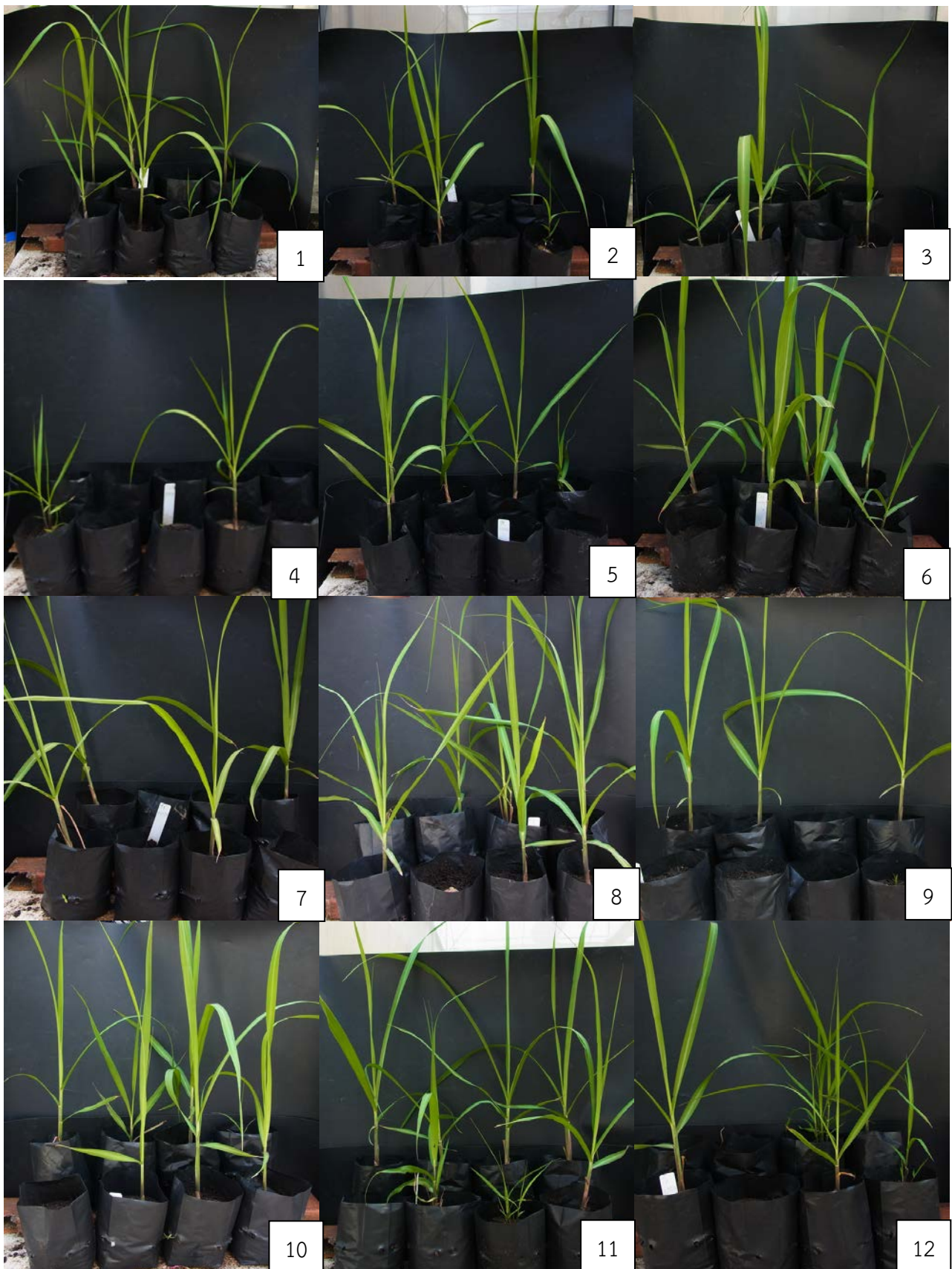
เปอร์เซ็นต์ความงอกของแต่ละกรรมวิธี											
T1*	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
11.11	33.33	11.11	33.33	88.89	88.89	33.33	11.11	0.00	44.44	44.44	66.67

*T1 = tetracycline 250ppm, 54°C, 15min; T2 = tetracycline 250ppm, 54°C, 30min; T3 = tetracycline 500ppm, 54°C, 15min; T4 = tetracycline 500ppm, 54°C, 30min; T5 = น้ำ 54°C, 15min; T6 = น้ำ 54°C, 30min; T7 = tetracycline 250ppm, 15min; T8 = tetracycline 250ppm, 30min; T9 = tetracycline 500ppm, 15min; T10 = tetracycline 500ppm, 30min; T11 = น้ำ, 15min; T12 = น้ำ, 30min

ตารางที่ 12 ความงอกของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot tetracycline treatment

	เปอร์เซ็นต์ความงอกของแต่ละกรรมวิธี											
	T1*	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
%การงอก	50.00	77.78	37.50	87.50	87.50	50.00	87.50	62.50	62.50	20.00	62.50	87.50
ความสูงเฉลี่ย (cm.)	51.75	41.57	47.67	41.43	42.14	30.00	37.86	37.00	27.60	19.00	35.60	40.71
SD	2.63	10.63	0.58	16.23	17.18	12.88	20.70	14.70	17.47	1.41	13.24	13.39

*T1 = tetracycline 250ppm, 54°C, 15min; T2 = tetracycline 250ppm, 54°C, 30min; T3 = tetracycline 500ppm, 54°C, 15min; T4 = tetracycline 500ppm, 54°C, 30min; T5 = น้ำ 54°C, 15min; T6 = น้ำ 54°C, 30min; T7 = tetracycline 250ppm, 15min; T8 = tetracycline 250ppm, 30min; T9 = tetracycline 500ppm, 15min; T10 = tetracycline 500ppm, 30min; T11 = น้ำ, 15min; T12 = น้ำ, 30min



ภาพที่ 34 การออกและการเจริญเติบโตของท่อนพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่ผ่านการกำจัดเชื้อด้วยวิธี Hot tetracycline treatment แบบต่างๆ ที่อายุ 1 เดือนหลังปลูก

4.4.1.3 ผลของ tetracycline treatment ต่อความงอกตาในตำแหน่งต่างๆ ของท่อนพันธุ์อ้อย

ผลการทดลองพบว่าที่ 8 วันหลังการเพาะตาอ้อยที่ส่วนยอดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสุดเมื่อเทียบกับตาอ้อยส่วนกลางและโคนลำต้น ในทุกกรรมวิธี ยกเว้นกรรมวิธีที่ 2 แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 30 นาทีและ กรรมวิธีที่ 6 แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 30 นาที

ตารางที่ 13 อัตราความงอกของข้อตาอ้อยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 8 วัน ภายหลังการเพาะ

กรรมวิธี	%ความงอกของตาอ้อย		
	ยอด	กลาง	โคน
1. แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 15 นาที	80.00	66.67	16.67
2. แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 30 นาที	60.00	66.67	33.33
3. แช่น้ำ 54 °C, 15 นาที	100.00	66.67	50.00
4. แช่น้ำ 54 °C, 30 นาที	100.00	66.67	0.00
5. แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	55.55	33.33
6. แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 30 นาที	40.00	55.55	0.00
7. แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	55.55	60.00
8. แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 30 นาที	100.00	66.67	16.67
9. ไม่แช่น้ำ	100.00	66.67	25.00
ค่าเฉลี่ย	86.67	62.96	26.11

ตารางที่ 14 อัตราความงอกของข้อตาอ้อยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 17 วัน ภายหลังการเพาะ

กรรมวิธี	%ความงอกของตาอ้อย		
	ยอด	กลาง	โคน
1. น้ำอุณหภูมิห้อง 15 นาที	100.00	77.78	16.67
2. น้ำอุณหภูมิห้อง 30 นาที	80.00	77.78	33.33
3. น้ำ 54 °C, 15 นาที	80.00	66.67	100.00
4. น้ำ 54 °C, 30 นาที	80.00	88.89	33.33
5. tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	66.67	83.33
6. tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 30 นาที	40.00	66.67	0.00
7. tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	77.78	80.00
8. tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 30 นาที	100.00	66.67	33.33
9. ไม่แช่น้ำ	100.00	77.78	50.00
ค่าเฉลี่ย	86.67	74.08	47.78

ตารางที่ 15 อัตราความงอกของข้อต้ออัยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 30 วัน ภายหลังการเพาะ

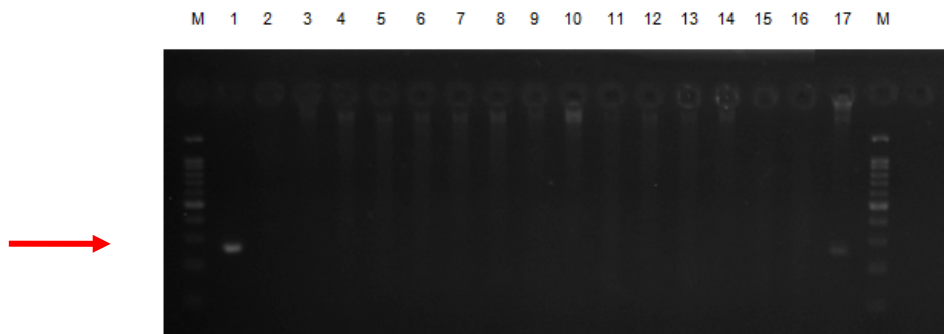
กรรมวิธี	%ความงอกของต้ออัย		
	ยอด	กลาง	โคน
1. แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 15 นาที	100.00	77.78	16.67
2. แช่น้ำอุณหภูมิห้อง 30 นาที	100.00	88.89	50.00
3. แช่น้ำ 54 °C, 15 นาที	100.00	66.67	100.00
4. แช่น้ำ 54 °C, 30 นาที	100.00	88.89	50.00
5. แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	66.67	83.33
6. แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 30 นาที	40.00	66.67	16.67
7. แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	77.78	80.00
8. แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 30 นาที	100.00	66.67	33.33
9. ไม่แช่น้ำ	100.00	77.78	100.00
ค่าเฉลี่ย	93.33	75.31	58.89

4.4.1.4 ผลของ tetracycline treatment ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในข้อต้ออัย

จากการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อยในต้นกล้าด้วยเทคนิค Conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SecAfor/SecArev พบว่าให้ผลเป็นบวกเพียงตัวอย่างที่ใช้เป็น positive control และตัวอย่างที่ 17 คือ ต้นกล้าที่เพาะจากท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคใบขาว และไม่มีการกำจัดเชื้อโดยการแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อนหรือยาปฏิชีวนะร้อน (ภาพที่ 35) และกำลังดำเนินการตรวจสอบตัวอย่างอื่นๆ เพิ่มเติม

ตารางที่ 16 อัตราความงอกของข้อต้ออัยกรรมวิธีต่างๆ ที่ 30 วัน ภายหลังการเพาะ

กรรมวิธี	% ความงอก	ความสูง (ซม.)
1. แช่น้ำ 54 °C, 15 นาที	100.00	52.2
2. แช่น้ำ 54 °C, 30 นาที	83.33	49.8
3. แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	41.5
4. แช่ tetracycline HCl 250 ppm, 54 °C, 30 นาที	33.33	12.5
5. แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 15 นาที	83.33	55.6
6. แช่ tetracycline HCl 500 ppm, 54 °C, 30 นาที	83.33	48.6
7. แช่ phyto 250 ppm, 54 °C, 15 นาที	100.00	45.5
8. แช่ phyto 250 ppm, 54 °C, 30 นาที	50.00	37.3
9. แช่ phyto 500 ppm, 54 °C, 15 นาที	83.33	49.0
10. แช่ phyto 500 ppm, 54 °C, 30 นาที	33.33	14.0
11. control ไม่แช่	100.00	34.5



ภาพที่ 35 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวอ้อยในต้นกล้าด้วยเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *SecAfor/SecArev*:

- M = DNA Ladder 100 bp
- 1 = Plasmid S4 ที่ 10^{-4}
- 2 = H₂O (Negative control)
- 3 = T1.1 (อ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ)
- 4-5 = T1 (น้ำเปล่า 54 °C 15 นาที)
- 6 = T2 (น้ำเปล่า 54 °C 30 นาที)
- 7-8 = T3 (Tet 250 54 °C 15 นาที)
- 9 = T4 (Tet 250 54 °C 30 นาที)
- 10 = T5 (Tet 500 54 °C 15 นาที)
- 11 = T6 (Tet 500 54 °C 30 นาที)
- 12 = T7 (Phytio 250 54 °C 15 นาที)
- 13 = T8 (Phytio 250 54 °C 30 นาที)
- 14 = T9 (Phytio 500 54 °C 15 นาที)
- 15 = T10 (Phytio 500 54 °C 30 นาที)
- 16-17 = T11 (Control ไม่แช่)

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า การทำ hot water treatment และ hot tetracycline treatment จะมีผลต่อความงอกและการเจริญของข้อตาอ้อย โดยในการทดลองพบว่า ควรใช้ข้อตาอ้อยในส่วนยอดและส่วนกลางลำต้นในการทำ hot tetracycline treatment จะทำให้มีเปอร์เซ็นต์ความงอกที่ดีที่สุด ผลของการทำ hot water treatment และ tetracycline treatment ต่อการเกิดโรคใบขาวจากการทดลองพบว่า ข้อตาอ้อยที่เจริญขึ้นมาไม่แสดงอาการของโรคใบขาวที่ชัดเจน และเมื่อนำไปตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secAfor/secArev* พบว่าทุกกรรมวิธีตรวจไม่พบเชื้อสาเหตุโรคใบขาว

4.4.2 การทดสอบการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP) ในแปลงปลูกทดลอง

ทำการสร้างโรงเรือนป้องกันแมลงเพื่อใช้เพาะข้อตาอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย tetracycline HCl 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที โดยโรงเรือนมีขนาด กว้าง 5.50 x ยาว 40.00 ม. สูง 2.80 ม. ติดตั้งระบบน้ำภายในโรงเรือนแบบสปริงเกลอร์



ภาพที่ 36 โรงเรือนป้องกันแมลงเพื่อใช้ในการผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว

การผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว โดยทำการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 12 เดือน ที่มาจากกอเป็นโรคใบขาวระดับไม่รุนแรง rating scale 2 (ภาพที่ 19) นำมาตัดให้เป็นข้อตาเดี่ยว (single bud) คัดเลือกตาที่ยังสมบูรณ์ใส่ถุงตาข่าย 200 ตาต่อถุง แช่ tetracycline HCl ความเข้มข้น 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที ด้วยเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 1 (ภาพที่ 28) ที่พัฒนาจากโครงการนี้ หลังจากนั้นนำข้อตาอ้อยไปเพาะในถุงเพาะชำขนาด 3x6 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกเป็นกากตะกอนหม้อกรองของโรงงาน นำถุงชำข้อตาอ้อยไปวางในโรงเรือนกันแมลง แล้วรดน้ำอย่างสม่ำเสมอทุกวัน ทำการฉีดยาป้องกันกำจัดแมลงพาหะอย่างสม่ำเสมอ เมื่อกล้าชำอ้อยอายุ 1 เดือน จะนำไปย้ายปลูกตามกรรมวิธีต่างๆ แบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ในแปลงปลูกทดลอง



ภาพที่ 37 ขั้นตอนการผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคในโรงเรือนป้องกันแมลง



ภาพที่ 38 การเตรียมแปลงทดลองปลูกกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ในแปลงปลูกทดลอง



ภาพที่ 39 แปลงทดลองที่ 1 บ้านหนองกุ้งน้อย ต.แก้งแก อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม (10-12 มิถุนายน 2559)



ภาพที่ 40 แปลงทดลองที่ 2 บ้านเห้ใต้ ต.เห้ใต้ อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม (10-12 มิถุนายน 2559)



ภาพที่ 41 สภาพแปลงปลูก (ณ วันที่ 28 กรกฎาคม 2559) ถู่น้ำท่วมขังจนต้นกล้าตายทั้ง 2 แปลงทดลอง

สรุปผลการทดลอง

เนื่องด้วยทางนักวิจัยต้องการทำการปลูกอ้อยเพื่อให้สามารถเก็บผลผลิตให้ทันต่อระยะเวลาของโครงการวิจัย จึงได้ทำการผลิตกล้าอ้อยปลอดโรค และทำการเตรียมแปลงล่วงหน้าก่อนการขึ้นตัสัญญาโครงการฯ โดยดำเนินการ ตั้งแต่เดือน เมษายน 2559 ที่ผ่านมา และประสบปัญหาการสร้างเครื่องแห่ท่อนพันธุ์อ้อยได้ไม่ทันเวลาช่วงเก็บเกี่ยว ปกติ ทำให้ท่อนพันธุ์ที่นำมาใช้ทดลองมีอายุมากถึง 15 เดือน ประกอบกับช่วงเวลาที่นำกล้าพันธุ์อ้อยลงแปลงปลูกนั้นมีฝนตกลงมาในปริมาณมากและทำให้กล้าอ้อยในแปลงทดลองทั้ง 2 แห่ง แขน้ำนานจนต้นกล้าตายทั้งหมด ไม่สามารถเก็บผลการทดลองได้

การทดสอบการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (Neo-Intensive Practice, NIP) ในแปลงปลูกทดลองครั้งที่ 2 (2 ต.ค. 59)

การผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว

โดยทำการคัดเลือกอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 12 เดือน ที่มาจากกอเป็นโรคใบขาวระดับไม่รุนแรง rating scale 2 (ภาพที่ 19) นำมาตัดให้เป็นข้อตาเดียว (single bud) คัดเลือกตาที่ยังสมบูรณ์ใส่ถุงตาข่าย 200 ตาต่อถุง แห่ tetracycline HCl ความเข้มข้น 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที ด้วยเครื่องแห่ท่อนพันธุ์อ้อยแบบที่ 2 (ภาพที่ 31) ที่พัฒนาจากโครงการนี้ หลังจากนั้นนำข้อตาอ้อยไปเพาะในถุงเพาะชำขนาด 3x6 นิ้ว โดยใช้วัสดุปลูกเป็นกากตะกอนหมักกรองของโรงงาน นำถุงชำข้อตาอ้อยไปวางในโรงเรือนกันแมลงแล้วรดน้ำอย่างสม่ำเสมอทุกวัน ทำการฉีดยาป้องกันกำจัดแมลงพาหะอย่างสม่ำเสมอ เมื่อกล้าอ้อยอายุ 1 เดือน จะนำไปย้ายปลูกตามกรรมวิธีต่างๆ แบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ในแปลงปลูกทดลอง



ภาพที่ 42 การผลิตกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวครั้งที่ 2 (วันที่ 2 ตุลาคม 2559)



ภาพที่ 43 ต้นกล้าอ้อยอายุ 3 สัปดาห์ ที่ผ่านการทำ tetracycline treatment ความเข้มข้น 500ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที และชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่

สรุปผลการทดลอง

ความงอกของข้อตาอ้อยที่ผ่านการแช่ใน tetracycline HCl 500 ppm ที่ 54 °C นาน 30 นาที พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยเท่ากับ 71.25 ซึ่งมีค่าสูงกว่าข้อตาที่ไม่ผ่านการแช่ที่ทำการปลูกพร้อมกันซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความงอกเฉลี่ยเท่ากับ 54.84 โดยต้นกล้าที่ผ่านการแช่และไม่แช่จะทำการจะทำการตรวจเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในห้องปฏิบัติการต่อไป



ภาพที่ 44 การเตรียมแปลงทดลองปลูกกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ในแปลงปลูกทดลอง ณ บ้านหนองกุ้งเต่า ต.ท่าสองคอน อ.เมือง จ.มหาสารคาม

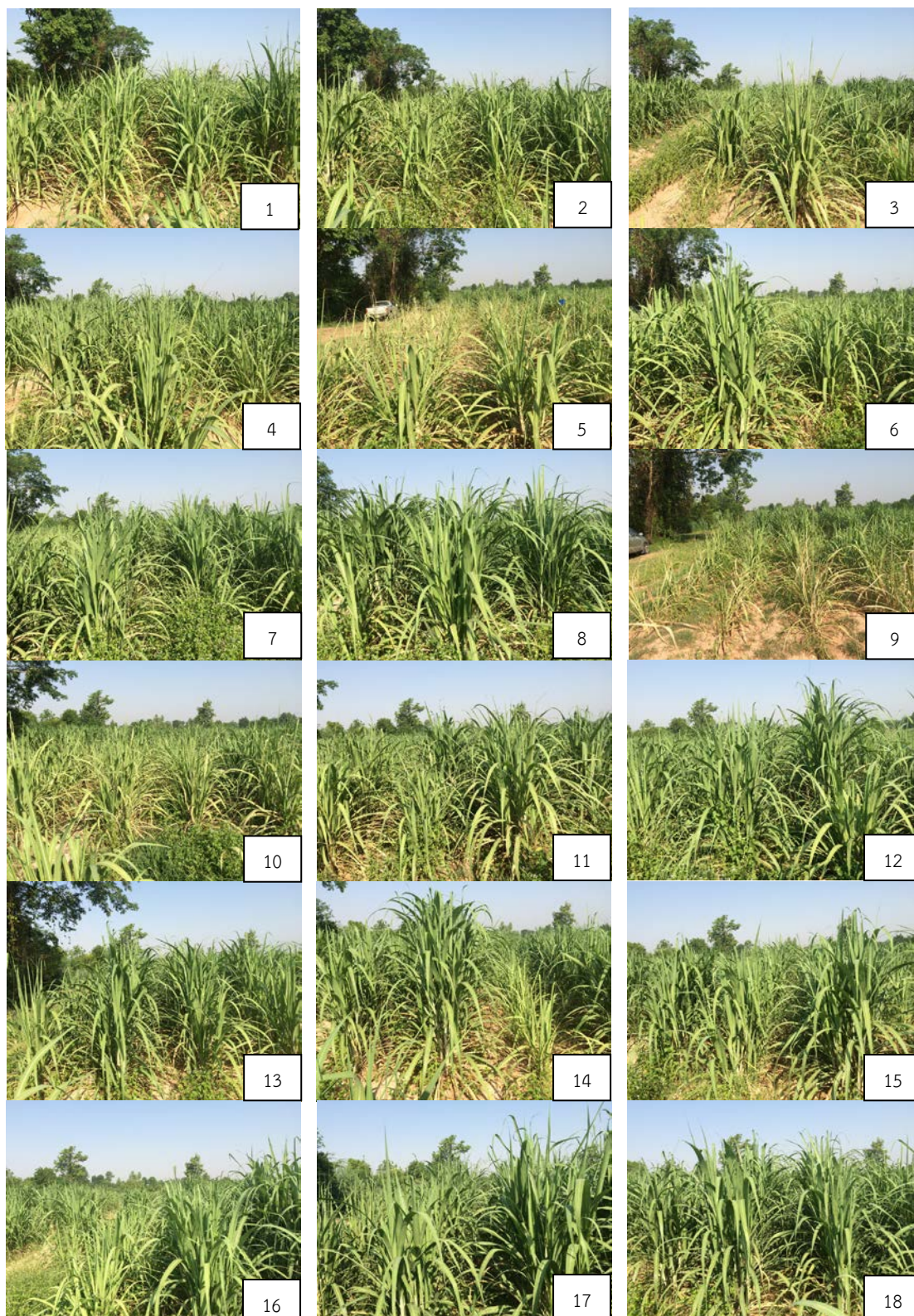


29 T8R4 (SL1 Ins1 Fer2)	30 T7R4 (SL1 Ins1 Fer1)	31 T1R4 (SL2 Ins2 Fer2)	32 T2R4 (SL2 Ins2 Fer1)
25 T3R4 (SL1 Ins2 Fer2)	26 T4R4 (SL1 Ins2 Fer1)	27 T6R4 (SL2 Ins1 Fer2)	28 T5R4 (SL2 Ins1 Fer1)
21 T5R3 (SL2 Ins1 Fer1)	22 T6R3 (SL2 Ins1 Fer2)	23 T3R3 (SL1 Ins2 Fer2)	24 T4R3 (SL1 Ins2 Fer1)
17 T1R3 (SL2 Ins2 Fer2)	18 T2R3 (SL2 Ins2 Fer1)	19 T8R3 (SL1 Ins1 Fer2)	20 T7R3 (SL1 Ins1 Fer1)
13 T2R2 (SL2 Ins2 Fer1)	14 T1R2 (SL2 Ins2 Fer2)	15 T4R2 (SL1 Ins2 Fer1)	16 T3R2 (SL1 Ins2 Fer2)
9 T6R2 (SL2 Ins1 Fer2)	10 T5R2 (SL2 Ins1 Fer1)	11 T8R1 (SL1 Ins1 Fer2)	12 T7R2 (SL1 Ins1 Fer1)
5 T5R1 (SL2 Ins1 Fer1)	6 T6R1 (SL2 Ins1 Fer2)	7 T7R1 (SL1 Ins1 Fer1)	8 T8R1 (SL1 Ins1 Fer2)
1 T1R1 (SL2 Ins2 Fer2)	2 T2R1 (SL2 Ins2 Fer1)	3 T3R1 (SL1 Ins2 Fer2)	4 T4R1 (SL1 Ins2 Fer1)

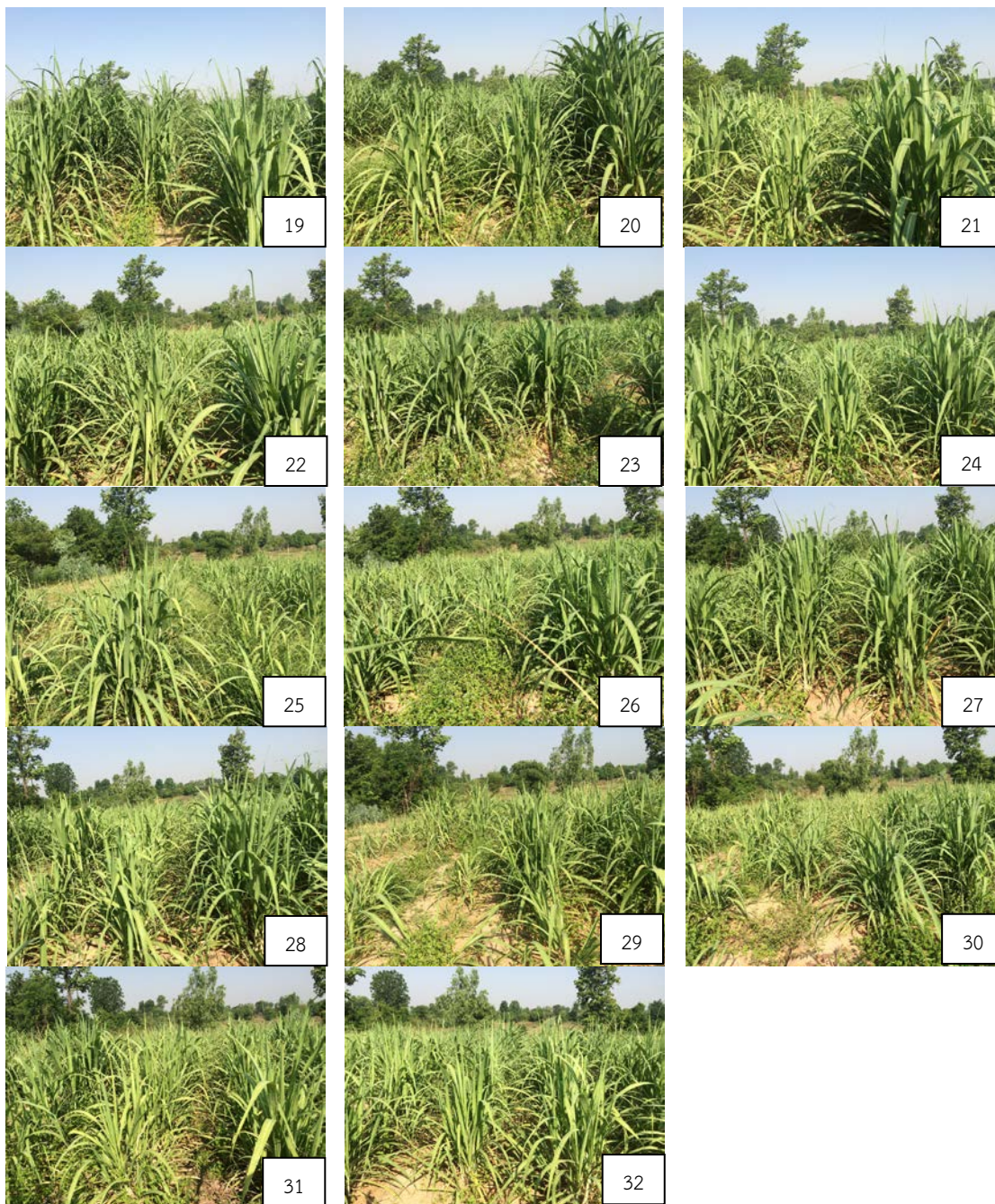
ภาพที่ 45 แผนผังแปลงทดลองการปลูกกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบ NIP

- กรรมวิธีที่ 1 ตันกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยชี้ไก่+ปุ๋ยสั่งตัด (SL2,Ins2,Fer2)
- กรรมวิธีที่ 2 ตันกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน (SL2,Ins2,Fer1)
- กรรมวิธีที่ 3 ตันกล้าไม่แช่ยา, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยชี้ไก่+ปุ๋ยสั่งตัด (SL1,Ins2,Fer2)
- กรรมวิธีที่ 4 ตันกล้าไม่แช่ยา, ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน (SL1,Ins2,Fer1)
- กรรมวิธีที่ 5 ตันกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน (SL2,Ins1,Fe1)
- กรรมวิธีที่ 6 ตันกล้าแช่ยาปฏิชีวนะร้อน, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยชี้ไก่+ปุ๋ยสั่งตัด (SL2,Ins1,Fer2)
- กรรมวิธีที่ 7 ตันกล้าไม่แช่ยา, ไม่ใส่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยอินทรีย์โรงงาน (SL1,Ins1,Fer1)

กรรมวิธีที่ 8 ต้นกล้าไม้ไผ่ยา, ไม้ไผ่ยาป้องกันแมลงพาหะ, ใส่ปุ๋ยซีไก่อ+ปุ๋ยสังแดด (SL1,Ins1,Fer2)



ภาพที่ 46 การเจริญเติบโตของกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวในแปลงปลูกทดลอง



ภาพที่ 46 (ต่อ)

ตารางที่ 17 การเจริญเติบโตของอ้อยปลูกตลอดปีชาวด้วยระบบ NIP ที่อายุ 8 เดือน

กรรมวิธี	ความสูง (ซม)	จำนวนลำตอก	ความหวาน Brix
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	225.8	5.33	17.32
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	238.3	5.59	16.32
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	185.4	5.67	15.46
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	191.2	5.42	18.04
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	185.4	4.67	14.98
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	191.3	4.83	17.57
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	204.2	4.92	17.44
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	217.9	5.08	17.38

ตารางที่ 18 การเจริญเติบโตของอ้อยปลูกตลอดปีชาวด้วยระบบ NIP ที่อายุ 10 เดือน

กรรมวิธี	ความสูง (ซม)	จำนวนลำตอก	ความหวาน Brix
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	260.4	4.84	18.35
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	271.3	4.92	18.87
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	215.8	4.75	17.79
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	222.5	4.67	19.64
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	224.2	3.75	17.20
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	232.9	4.50	20.83
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	230.4	4.67	19.35
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	247.1	4.58	19.97

ตารางที่ 19 ผลผลิตของอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบ NIP ที่อายุ 12 เดือน

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยผลผลิต ต้น/ไร่	%CV	ค่าเฉลี่ยจำนวนลำต่อไร่	%CV	ค่าเฉลี่ย CCS
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	13.2	25.6	8,250	15.5	13.98
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	12.9	37.4	7,450	24.9	14.19
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	14.0	18.0	8,400	8.5	14.63
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	12.0	15.5	7,500	14.0	13.42
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	11.2	12.3	7,750	19.4	14.04
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	11.0	23.2	6,600	8.0	13.77
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	13.1	37.4	7,500	31.7	14.27
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	14.7	9.9	8,750	3.4	13.57

ตารางที่ 20 ความสูงลำต้น, จำนวนลำต่อกอ และค่าบrix ที่อายุ 8 และ 9 เดือน, น้ำหนักต่อลำ, จำนวนลำต่อไร่, ค่าซีซีเอส, และผลผลิต (ต้น/ไร่) ของ 8 กรรมวิธีทดลองที่ปลูกในแปลงเกษตรกร อ. โกสุมพิสัย จ. มหาสารคาม ปี 2560

กรรมวิธีทดลอง	ความสูงลำ (ซม.)		จำนวนลำต่อกอ		ค่าบrix(%)		น้ำหนักต่อลำ (กก.)	จำนวนลำต่อไร่	ซีซีเอส	ผลผลิต (ต้น/ไร่)
	8 เดือน	9 เดือน	8 เดือน	9 เดือน	8 เดือน	9 เดือน				
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	225.8 ab	260.4 ab	5.3	4.9	17.3	18.4	1.58	8,250	13.98	13.20
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	238.2 a	271.2 a	5.6	4.9	16.3	18.9	1.73	7,450	14.18	12.88
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	185.4 c	215.8 c	5.7	4.8	15.5	17.8	1.70	8,400	14.63	14.03
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	191.2 bc	222.5 c	5.4	4.7	18.1	19.7	1.63	7,500	13.43	12.03
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	185.4 c	224.2 c	4.7	3.8	15.0	17.2	1.48	7,750	14.05	11.15
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	191.2 bc	232.9 bc	4.8	4.5	17.9	20.8	1.54	6,467	13.75	9.98
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	204.1 abc	230.4 bc	4.9	4.7	17.5	19.3	1.73	7,500	14.28	13.10
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	217.9 abc	247.0 abc	5.1	4.6	17.4	20.0	1.70	8,750	13.55	14.75
ค่าเฉลี่ย	204.9	238.1	5.2	4.9	16.8	19.0	1.63	7,758	13.98	12.64
F-test	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV(%)	11.62	9.12	16.03	18.53	10.58	9.99	15.25	18.90	7.42	21.61

หมายเหตุ *,** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ, ns = ไม่แตกต่างทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละคู่ด้วยวิธี “Duncan's Multiple Range Test (DMRT)” โดยตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ

SL1 = ปลูกโดยท่อนพันธุ์ที่ไม่แช่น้ำร้อนและสารเคมี, SL2 = ปลูกโดยต้นกล้าที่ผ่านการแช่ท่อนพันธุ์ด้วยน้ำร้อนและสารเคมี

Ins1 = ไม่ป้องกันแมลงพาหะ, Ins2 = ป้องกันแมลงพาหะที่ระยะงอก แดกกอ และย่างปล้อง

Fer1 = ใส่ปุ๋ยตามคำแนะนำจากโรงงาน, Fer2 = ใส่ปุ๋ยอินทรีย์+ปุ๋ยสังเคราะห์ (1 เดือน = 46-0-0 (2kg/rai) + 18-46-0 (13kg/rai) + 0-0-60, 3

เดือน = 46-0-0 (7kg/rai), 7-8 เดือน = 46-0-0 (9kg/rai))

ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากแปลงปลูกระบบ NIP ด้วยเทคนิค conventional PCR

ตารางที่ 21 ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากกล้าอ้อยที่เริ่มปลูก ในแปลงทดลองระบบ NIP

กรรมวิธี	ผลการตรวจโรคใบขาวด้วย PCR			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	-	-	-	-
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	-	-	-	-
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	-	-	-	-
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	-	-	-	-
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	-	-	-	-
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	-	-	-	-
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	-	-	-	-
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	-	-	-	-

ตารางที่ 22 ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากอ้อยอายุ 4 เดือน ในแปลงทดลองระบบ NIP

กรรมวิธี	ผลการตรวจโรคใบขาวด้วย PCR			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	-	-	-	-
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	-	-	-	-
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	++	-	-	-
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	-	-	-	-
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	-	++++	-	-
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	-	-	+	-
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	-	-	-	-
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	-	-	-	-

ตารางที่ 23 ผลการตรวจโรคใบขาวอ้อยจากอ้อยอายุ 6 เดือน ในแปลงทดลองระบบ NIP

กรรมวิธี	ผลการตรวจโรคใบขาวด้วย PCR			
	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	+	+	-	+
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	+	+	-	-
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	+	+	-	-
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	+	+	-	-
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	+	+	-	-
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	+	+	-	-
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	+	+	-	-
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	++	+	+	-

หมายเหตุ:

- = negative/ ให้ผลลบ
- + = very weak positive
- ++ = weak positive
- +++ = moderate positive
- ++++ = strong positive

ตารางที่ 24 ชนิดและจำนวนแมลงที่พบในแปลงอ้อยทดลองจากการใช้กับดักแสงไฟ ในช่วงเดือน มิถุนายน-สิงหาคม 2560 (ที่อ้อยอายุ 7-9 เดือน)

วงศ์	จำนวนแมลงแต่ละชนิด (ตัว)		
	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม
Aderidae		7	
Bostrichidae		2	4
Coccinellidae		1	1
Blattellidae	26	14	
Carabidae	213	53	39
Chrysomelidae	215	6	7
Curculionidae	140	2	
Cucujidae		1	1
Dytiscidae	47	18	1
Elateridae	118	384	218
Heteroceridae	138		27
Noteridae		2	
Mordellidae	1		
Nitidulidae	3		26
Platypodidae	5		
Pselaphidae	54		
Scarabaeidae	289		
Scolytidae	11	7	
Staphylinidae	3790	680	1328
Tenebrionidae	10		
Cydnidae	128	41	22
Hydrometridae	2	5	14
Lygaeidae		17	6
Notonectidae	81		4
Pentatomidae	1	1	
Reduviidae	1	15	
Noctuidae	30		3
Mantidae	3		2

Gryllidae	8		5
Tetrigidae	4		
Tettigoniidae	1		
Tridactylidae	6		2
Cicadellidae	79	19	40

ตารางที่ 24 (ต่อ)

วงศ์	จำนวนแมลงแต่ละชนิด (ตัว)		
	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม
Muscidae		1	
Dictyopharidae		48	
Formicidae	13	58	105
Amatidae		9	
Lampyridae			7
Corixidae		2	1
Pyalidae	3		13
Chrysopidae	1		4
Psocoptera			1
Isoptera	4	2	69
Rutellidae			23
Alydidae			4
Cicindellidae	2		2
Blaberidae			6
Cleridae			1
Trichoptera	14	9	29
Derbidae	1		3

แมลงที่พบในแปลงจากกับดักแสงไฟ มีแมลงในกลุ่มเพลี้ยจักจั่น Cicadellidae อยู่ประมาณ 19-79 ตัวซึ่งมีปริมาณน้อย เมื่อเทียบจำนวนชนิดของแมลงที่พบในแปลงเดือนสิงหาคมจะพบชนิดแมลงได้มากกว่า เมื่อเทียบดูชนิดของแมลงที่พบในแปลงวิจัยแล้วพบว่าชนิดที่เป็นแมลงศัตรูอ่อนนั้นมีน้อย ซึ่งได้แก่ แมลงในกลุ่ม Cicadellidae ส่วนแมลงที่มีประโยชน์พบได้หลากหลายชนิด เช่น แมลงในกลุ่ม Carabidae Reduviidae เป็นต้น

ตารางที่ 25 ชนิดและจำนวนแมลงที่ติดในกับดักกาเวนี้ยวสีน้ำเงิน เก็บข้อมูลครั้งที่ 1 มิถุนายน 2560 (อ้อยอายุ 7 เดือน)

Family	แปลงที่																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Acrididae	2			1					2				1																			
Tridactylidae									3			2		1					1	1	2		1	1	1	3		1				
Mantidae								1											1							1						
Blatellidae						1	2		2			1		1				2											1			
Homoptera			2	1						1					5	5																
Cicadellidae	22	12	23	48	58	34	40	17	37	39	25	19	31	17	8	12	36	46	35	40	33	38	25	63	52	13	42	12	28	26	35	22
- <i>M. hiroglyphicus</i>						2										2																
- <i>Y. flavovittatus</i>			3						1														2							1		
Derbidae	1	1	1	4	9		5	4		7		11	1				4	7		3	3	1	6	14	1		1		1	3		14
Lophopidae			1	4			2	1									4	5	2	3	2	4	3	10		3	3		1		2	
Hemiptera	2	3	3	1	1	1	1	1	3	5		6	2	3	4			2	1		1			7	1		1		3	3	1	
Lepidoptera											1	2		1		2	1		1						1	2				1		
Coleoptera	3	1	4	1	8	1	8	1	76		2	1	8	1	1	9		6						3	1	4	1	8	1	8	1	76
Elateridae					6	1		3																				6	1		3	
Curculionidae		1																								1						
Hymenoptera	2	8	7	17	8	1																		2	8	7	17	8	1			
Formicidae	8				100			66	9	2	18	6	31	17	19	10	15	28		7	87	40	36	8				100			66	9
Diptera	31	45	45	24	62	52	68	20	7	32	11	7	53	30	24	45	34	44	53	64	32	77	58	31	45	45	24	62	52	68	20	7
Dermaptera	5		1	1	1			1									1	3						5		1	1	1			1	
Isoptera					1																					1						
Lepidoptera			1						1		1	2		1		2																

ตารางที่ 26 ชนิดและจำนวนแมลงที่ติดในกับดักกาเหวสีน้ำเงิน เก็บข้อมูลครั้งที่ 2 กรกฎาคม 2560 (อ้อยอายุ 8 เดือน)

Family	แปลงที่																															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Acrididae									1													4		1	1							1
Tridactylidae				4			1												1	1												
Mantidae											2																					
Blatellidae				1	3	2		2				3				1																
Homoptera						1		4																								
Cicadellidae	3	11	17		12	15	24	4	31	10	14	32	4	5	32	19	27	28	19	10	4	16				10	7	4	9	13	5	1
- <i>M. hiroglyphicus</i>																																
- <i>Y. flavovitatus</i>																																
Derbidae	1	1	2		4	1		1						1	17		3	1	2		1									2	1	1
Lophopidae	1	1	2			1		1						1				2	2		3						1					
Hemiptera								2						1				1		4			4		1				1		2	1
Lepidoptera							1						2																			
Coleoptera		5	2	2	2	3	1	5	3	3	2	3		9	2	11		4	2	2	2	46	13	6	14	6	11	7	8	3	10	6
Coccinellidae	1	5	4	3	13	17	1	7	11	8	8	10	3	4		2	2		1	3	8											
Elateridae	2	3	3		5			9	8	4	1		2	3		5	7	6	3	2	50											
Curculionidae	1									1		2							1		2											
Staphylinidae			1		3	2								1			2		1													
Hymenoptera	9	4	1		4			4	5	2	4	1	9	1				1		33	16					5	22	21	6	17	16	5
Formicidae	2	3	4	5	3	7	5		3		4	11		2	8	7	2	2	2			7	2									
Diptera	1		2	1	6	5	2	1		2	6	2	3	1	19		2	2	5	10		1	3	13	6	14	4	6	2	38	32	5
Dermaptera			3					1																			1					
Isoptera																	1															

การวางกับดักกาเหวินเพื่อตรวจสอบชนิดของแมลงที่เข้าทำลายอ้อยที่ปลูกในแต่ละกรรมวิธี ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 25 และ 26 นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าผลที่ได้แสดงในตารางที่ 27 การแช่ท่อนพันธุ์ด้วยยาปฏิชีวนะร้อนและร่วมกับการป้องกันแมลงพาหะด้วยสารเคมีที่ระยะงอกแตกกอและอย่างปล้องด้วยสารเคมีส่งผลต่อจำนวนแมลงในวงศ์ Cicadellidae ซึ่งจะทำให้มีจำนวนน้อยกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการปฏิบัตินี้

ตารางที่ 27 จำนวนแมลงในวงศ์ Cicadellidae

กรรมวิธี	จำนวนเพลี้ยในวงศ์ Cicadellidae	
	ครั้งที่1 (อ้อย 7 เดือน)	ครั้งที่2 (อ้อย 8 เดือน)
Tr.1 SL2,Ins2,Fer2	5.00 e	11.00 c
Tr.2 SL2,Ins2,Fer1	6.00 e	13.50 c
Tr.3 SL1,Ins2,Fer2	7.25 de	25.50 b
Tr.4 SL1,Ins2,Fer1	7.75 cde	25.25 b
Tr.5 SL2,Ins1,Fe1	13.50 bcd	28.00 ab
Tr.6 SL2,Ins1,Fer2	14.75 abc	30.25 ab
Tr.7 SL1,Ins1,Fer1	21.00 a	39.50 a
Tr.8 SL1,Ins1,Fer2	20.00 ab	37.00 ab
P-value	0.0002	0.0002
F-test	**	**
CV (%)	38.98	28.18

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าการทดสอบการปลูกอ้อยด้วยระบบแบบประณีตแนวใหม่ (NIP) ด้วยการใช้ต้นกล้าอ้อยที่ผ่านการทำ hot tetracycline treatment ร่วมกับการใช้สารป้องกันกำจัดแมลงพาหะ และใส่ปุ๋ยที่มีความเหมาะสมกับพื้นที่ ผลการทดลองพบว่าทุกกรรมวิธียังไม่มีความแตกต่างของการเจริญและผลผลิตที่ชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(Tr.7) การติดตามแมลงพาหะโรคใบขาวในแปลงทดลองพบว่าปริมาณน้อยและในกรรมวิธีที่มีการใส่สารป้องกันแมลงพาหะพบว่ามีแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญของจำนวนแมลงในวงศ์ Cicadellidae ซึ่งเป็นวงศ์ของแมลงพาหะเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใช้สารเคมี (Tr.5,6,7,8) ส่วนการติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงปลูกทดลองจากการแสดงออกและการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่ายังไม่มี ความแตกต่างที่ชัดเจนจากชุดควบคุม(Tr.7) โดยพบว่าโรคใบขาวสามารถตรวจพบได้ในทุกกรรมวิธีทดลองเมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน แต่ยังไม่พบอาการโรคใบขาวที่แตกต่างกันซึ่งอาจต้องมีการติดตามการแสดงออกของอาการโรคใบขาวอ้อยภายหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป เนื่องจากโรคใบขาวเป็นโรคที่มีการแสดงออกที่ชัดเจนในอ้อยตอมมากกว่าอ้อยปลูก

4.5 การอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยยาปฏิชีวนะร้อน

4.5.1 การอบรมถ่ายทอดความรู้การทำ hot tetracycline treatment เพื่อกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้กับเกษตรกรผู้ปลูกอ้อย ภายใต้โครงการฝึกอบรม “การจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดโดยใช้พันธุ์อ้อยจากการชำกล้าอ้อย” วันที่ 14 พฤศจิกายน 2559 ณ โรงงานน้ำตาลวังขนาย จ.มหาสารคาม



ทางนักวิจัยในโครงการ การผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแบบประณีตแนวใหม่ในสภาพโรงเรือน อนุบาลและแปลงปลูก ได้รับเชิญจากทาง โรงงานน้ำตาลวังขนาย (มหาวัง) ในการอบรมให้ความรู้กับเกษตรกร ตัวแทนจำนวน 14 ราย เพื่อทำการผลิตกล้าพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยวิธี hot tetracycline treatment ซึ่งเกษตรกรทำให้มีความรู้ความเข้าใจถึงหลักการในการทำ hot tetracycline treatment รวมถึงได้ร่วมปฏิบัติในการผลิตกล้าพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยวิธี hot tetracycline treatment และทำการเพาะกล้าจำนวนรายละ 2,500 กล้า

4.5.2 การอบรมถ่ายทอดความรู้การทำ hot tetracycline treatment เพื่อกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้กับเกษตรกรผู้ปลูกอ้อย ภายใต้โครงการฝึกอบรม “การจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดโดยใช้พันธุ์อ้อยจากการฆ่ากล้ำอ้อย” วันที่ 16 มกราคม 2560 ณ โรงงานน้ำตาลวังขนาย จ.มหาสารคาม



ทางนักวิจัยได้อบรมให้ความรู้กับเกษตรกรตัวแทนจำนวน 16 ราย เพื่อทำการผลิตกล้าพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยวิธี hot tetracycline treatment

4.5.3 การอบรมถ่ายทอดความรู้การทำ hot tetracycline treatment เพื่อกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้กับเกษตรกรผู้ปลูกอ้อย ภายใต้โครงการฝึกอบรม“การจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดโดยใช้พันธุ์อ้อยจากการชำกล้าอ้อย” วันที่ 29 กันยายน 2560 ณ ศูนย์ถ่ายทอดเทคโนโลยีเฉลิมพระเกียรติ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



สรุปแบบประเมินก่อนการอบรมโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป เกษตรกรเข้าร่วมการอบรม 61 ราย

1. เพศ ชาย = 19 คน 54% หญิง = 16 คน 46%

2. อายุ (ปี) 20-30 = 7 คน 20% 31-40 = 7 คน 20% 41-50 = 12 คน 34% 51-60 = 6 คน 17% มากกว่า 60 = 3 คน 9%

3. ระดับความรู้ ต่ำกว่ามัธยมต้น = 13 คน 37% มัธยมศึกษาตอนต้น/ป.ว.ช. = 6 คน 17%

มัธยมศึกษาตอนปลาย/ป.ว.ส. = 13 คน 37% ปริญญาตรี = 3 คน 9%

สูงกว่าปริญญาตรี = 0%

4. อาชีพ เกษตรกร = 27 คน 77%

ปลูกอ้อยจำนวน (ไร่) น้อยกว่า 10 = 0%

10 – 30 = 15 คน 74%

31 – 60 = 4 คน 15%

61 – 80 = 1 คน 4%

81 – 100 = 0 %

มากกว่า 100 = 2 คน 7%

พนักงานบริษัท/เอกชน = 8 คน 23%

5. ท่านมีประสบการณ์ปลูกอ้อยมาแล้วกี่ปี น้อยกว่า 1 = 0%

1 – 5 = 43% (15 คน)

6 – 10 = 26% (9 คน)

11 – 15 = 6% (2 คน)

มากกว่า 15 = 0%

ไม่ระบุ = 25% (8 คน)

ตอนที่ 2 ความคิดเห็น

1. ท่านคิดว่าโรคใบขาวอ้อยเป็นปัญหาที่มีความสำคัญมากที่สุดในการปลูกอ้อยใช่หรือไม่
ใช่ = 26% ปัญหาที่สำคัญคือ ทำให้อ้อยไม่ขึ้นแล้วตายในที่สุด
ไม่ใช่ = 74% ปัญหาที่สำคัญคือ หนอนกออ้อย และสภาพฝนฟ้าอากาศ
2. ท่านคิดว่าโรคใบขาวเกิดจากสาเหตุใด
แมลง = 17% เชื้อโรค = 20% ขาดปุ๋ย = 0%
อื่นๆ เกิดจากดินที่ไม่ได้มีการเสริมโพแทสเซียมของดิน เกิดจากภูมิอากาศฝนไม่ตกตามฤดูกาล ภัยแล้งทำให้อ้อยแห้งแล้วทำให้เกิดโรคใบขาวได้
3. ท่านคิดว่าโรคใบขาวแพร่ระบาดได้อย่างไร (ตอบได้มากกว่าหนึ่งข้อ)
แมลง = 20% ท่อนพันธุ์ = 26% ดิน = 6% ลม = 0% ฝน = 0%
4. ท่านคิดว่าโรคใบขาวอ้อยสามารถรักษาให้หายได้หรือไม่
ได้: ถ้าบำรุงให้น้ำและปุ๋ย = 3% ไม่ได้ เพราะเชื้อโรคยังคงอยู่ในดิน = 17%
อื่นๆ ต้องทำการตัดต้นทิ้ง ขุดต้นทิ้งและเลือกท่อนพันธุ์ให้ดี
5. ท่านจะทำอย่างไรเมื่อพบว่าอ้อยที่ปลูกเป็นโรคใบขาว กรณีที่ท่านพบจำนวนหลายต้นในแปลงปลูก
ใส่ปุ๋ยแล้วโรคจะหาย = 0% โถทิ้งเพราะจะทำให้โรคระบาด = 23% ไม่ทำอะไรรอฝนมาจะหายเอง
อื่นๆ ทำการถอนทิ้ง ทำการขุดทิ้งแล้วเผาทำลาย พ่นสารดูดซึมและไถทำลายทิ้ง
6. ท่านคิดว่าสามารถทำให้ท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวได้โดยวิธีใด
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ = 11% แช่น้ำร้อน = 20% ไม่มี = 6%
อื่นๆ คัดท่อนพันธุ์ที่ไม่มีเชื้อ
7. ท่านคิดว่าอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีข้อดีหรือข้อเสียอย่างไร
ข้อดี ได้อ้อยสะอาดปลอดโรคใบขาวและเชื้อโรคไปปลูก การแตกกอดีลำต้นแข็งแรง
ข้อเสีย ต้นทุนสูง
8. ท่านคิดว่าอ้อยแช่น้ำร้อนมีข้อดีข้อเสียอย่างไร
ข้อดี ช่วยทำลายเชื้อโรคที่มากับท่อนพันธุ์ ทำให้ปลอดโรคใบขาว ป้องกันโรคใบขาว ลดการติดเชื้อในระดับหนึ่ง และลดต้นทุน
ข้อเสีย งบไม่คุ้มค่า การแตกกอน้อย การปฏิบัติทำได้น้อยและต้องใช้เวลาอย่างมากเมื่อต้องปลูกหลายไร่
9. ถ้าให้ท่านเลือกระหว่างวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกับแช่น้ำร้อนท่านจะเลือกวิธีการใดในการควบคุมโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย
แช่น้ำร้อน เพราะวิธีนี้เกษตรกรทำได้ด้วยตนเอง ทำง่าย อุปกรณ์หาง่าย ประหยัดเวลาและต้นทุนเมื่อต้องทำในปริมาณมาก ฆ่าเชื้อโรคใบขาวได้เคยทำได้ผลดี
เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะ น่าจะปลอดโรคกว่าการแช่น้ำร้อน ไม่มีเครื่องมือแช่น้ำร้อน และการแตกกอเยอะมาก

สรุปแบบประเมินหลังการอบรมโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว

ตอนที่ 1 ข้อมูลทั่วไป

1. เพศ ชาย = 24 คน 57% หญิง = 18 คน 43%

2. อายุ (ปี) 20-30 = 9 คน 21% 31-40 = 5 คน 12% 41-50 = 15 คน 36% 51-60 = 8 คน 19% มากกว่า 60 = 3 คน 7%

3. ระดับความรู้ ต่ำกว่ามัธยมต้น = 18 คน 43%

มัธยมศึกษาตอนต้น/ป.ว.ช. = 6 คน 14%

มัธยมศึกษาตอนปลาย/ป.ว.ส. = 14 คน 33%

ปริญญาตรี = 3 คน 7%

สูงกว่าปริญญาตรี = 0%

4. อาชีพ เกษตรกร = 32 คน 76%

ปลูกอ้อยจำนวน (ไร่) น้อยกว่า 10 = 0%

10 – 30 = 64% (27 คน)

31 – 60 = 12% (5 คน)

61 – 80 = 5% (2 คน)

81 – 100 = 0%

มากกว่า 100 = 5% (2 คน)

พนักงานบริษัท/เอกชน = 10 คน 24%

5. ท่านมีประสบการณ์ปลูกอ้อยมาแล้วกี่ปี น้อยกว่า 1 = 1 คน 2%

1 – 5 = 14 คน 33%

6 – 10 = 16 คน 38%

11 – 15 = 4 คน 10%

มากกว่า 15 = 1 คน 2%

ตอนที่ 2 ความคิดเห็น

1. ท่านคิดการซื้อท่อนพันธุ์อ้อยจากแหล่งใหม่จะช่วยแก้ปัญหาโรคใบขาวอ้อยได้หรือไม่
ได้ = 21% ไม่ได้ = 83%
2. ท่านคิดว่ามีความจำเป็นที่จะต้องทำพันธุ์อ้อยไว้ใช้เองหรือไม่
จำเป็น = 100% ไม่จำเป็น = 0%
3. ถ้าให้ท่านปลูกอ้อยด้วยวิธีการเพาะต้นกล้าจากข้อตาเพื่อทำพันธุ์สะอาดท่านจะทำหรือไม่
ทำ = 95% เพราะจะได้อ้อยที่ปลอดโรคใบขาว ผลผลิตจะได้สูงขึ้นรวมถึงรายได้ด้วย แต่ยังไม่มียุกรณ์เครื่องมือ
ไม่ทำ = 5% เพราะ มีความยุ่งยากและใช้งบประมาณสูง
4. ท่านคิดว่าวิธีการแช่ข้อตาอ้อยในยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบขาวอ้อยได้เพียงใด
มีประสิทธิภาพสูง = 50% มีประสิทธิภาพปานกลาง = 50% มีประสิทธิภาพน้อย = 0%
5. ท่านคิดว่าต้นทุนในการแช่ข้อตาอ้อยในยาปฏิชีวนะร้อนมีความคุ้มค่าหรือไม่
มี = 95% ไม่มี = 5%
6. หลังจากได้ต้นกล้าพันธุ์อ้อยสะอาดแล้วท่านจะเตรียมแปลงปลูกแบ่งส่วนจากอ้อยที่ปลูกทั่วไปหรือไม่
ทำ = 95% ไม่ทำ = 5%
7. ต้นกล้าพันธุ์อ้อยสะอาดเมื่อนำไปปลูกลงแปลงแล้วจะไม่ใช่โรคใบขาวใช่หรือไม่
ใช่ = 55% ไม่ใช่ = 45%
8. ต้นกล้าพันธุ์อ้อยสะอาดเมื่อนำไปปลูกลงแปลงแล้วจะต้องทำการดูแลรักษาอย่างประณีตหรือไม่
ใช่ = 95% ไม่ใช่ = 5%

สรุปผลการทดลอง

ผลการอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวด้วย hot tetracycline treatment พบว่าเกษตรกรผู้ปลูกอ้อยในพื้นที่ อ.โกสุมพิสัย จ.มหาสารคาม และพื้นที่ใกล้เคียงมีความรู้ความเข้าใจในการผลิตกล้าอ้อยด้วยวิธี hot tetracycline treatment มีการตอบรับและได้รับความร่วมมือที่ดีจากเกษตรกรในการทำ โดยเกษตรกรส่วนใหญ่ตระหนักถึงโรคใบขาวอ้อยซึ่งเป็นโรคที่สำคัญในการปลูกอ้อย และโรคนี้มีการระบาดไปกับท่อนพันธุ์อ้อยเป็นหลัก โดยมีสภาพแวดล้อมและการระบาดของแมลงพาหะเป็นปัจจัยส่งเสริม ทำให้เกษตรกรมีความจำเป็นที่จะต้องมีการคัดเลือกท่อนพันธุ์และหากระบวนการที่จะทำให้ท่อนพันธุ์มีความสะอาด ปราศจากเชื้อสาเหตุโรคใบขาว โดยวิธี hot tetracycline treatment เป็นวิธีที่เกษตรกรสามารถปฏิบัติได้เองโดยอาศัยเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่พัฒนาจากโครงการวิจัยนี้ ร่วมกับยาปฏิชีวนะ tetracycline HCl ที่สามารถหาซื้อได้เอง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เกษตรกรเคยได้รับการถ่ายทอดมา

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการผลิตอ้อยที่ผ่านมาของเกษตรกรไทยไม่ได้ให้ความสำคัญด้านคุณภาพหรือสุขภาพของท่อนพันธุ์อ้อยที่นำมาปลูก ซึ่งจะใช้ท่อนพันธุ์เท่าที่จะหาได้หรือที่ให้ผลผลิตสูงโดยไม่คำนึงถึงโรคติดต่อที่มากับท่อนพันธุ์ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีโรคต่างๆระบาด โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบขาว (sugarcane white leaf, SCWL) ที่ระบาดอย่างรุนแรงในพื้นที่ปลูกอ้อยต่างๆ ปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์อ้อยที่สามารถต้านทานต่อโรคนี้ อ้อยที่เป็นโรคใบขาวจะมีผลผลิตลดต่ำลงอย่างมาก และที่สำคัญเมื่ออ้อยเป็นโรคใบขาวจะทำให้เกษตรกรไม่สามารถไว้ต่ออ้อยได้หลายปีหรืออาจได้เพียงต่อเดียวในกรณีที่มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง ส่งผลให้การผลิตอ้อยของประเทศไทยมีต้นทุนที่สูงและผลผลิตต่ำกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศผู้ผลิตอ้อยของโลก

งานวิจัยนี้ได้เน้นไปที่การแก้ไขปัญหาการระบาดของโรคใบขาวอ้อยที่ติดมากับท่อนพันธุ์ ซึ่งทางคณะวิจัยได้พัฒนาเครื่องแช่ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีคุณสมบัติสามารถควบคุมอุณหภูมิของน้ำได้อย่างสม่ำเสมอ ใช้งานสะดวก และราคาไม่แพง ร่วมกับการจัดการกำจัดเชื้อที่ติดมากับท่อนพันธุ์ด้วยเทคนิคการแช่ในยาปฏิชีวนะร้อน (hot tetracycline treatment) ที่ได้ศึกษาวิจัยแล้วพบว่าทำให้สามารถลดการติดเชื้อของโรคใบขาวไปกับท่อนพันธุ์ที่จะนำไปปลูกได้ ร่วมกับการจัดการเทคโนโลยีการผลิตกล้าพันธุ์อ้อยในโรงเรือนและการจัดการแปลงปลูกอย่างประณีตที่มีการจัดการธาตุอาหารและควบคุมแมลงพาหะ นอกจากนี้ทางโครงการฯยังได้จัดการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยการใช้เทคนิคการแช่ในยาปฏิชีวนะร้อน พบว่าเกษตรกรให้ความสนใจและตอบรับเป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นเทคโนโลยีที่เกษตรกรสามารถทำได้ด้วยตนเอง สะดวก และมีต้นทุนในการทำถูกกว่าการผลิตกล้าปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ