

สัญญาเลขที่ RDG5950092
โครงการ “การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว”
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย/โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว

(ภาษาอังกฤษ) Multiplying technology of white leaf disease free sugarcane production

ชื่อผู้วิจัย นายรณภพ บรรเจิดเชิดชู

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

73140

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

ได้รับอนุมัติงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

งบประมาณที่ได้รับ 4,895,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 12 เดือน

เริ่มทำการวิจัยเมื่อ เดือนมิถุนายน 2559 ถึง เดือนพฤษภาคม 2560

รายงานครั้งที่ 3 ในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2559 ถึง 31 กรกฎาคม 2560

(ขยายเวลา 2 เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน ถึง 31 กรกฎาคม 2560)

ส่วนที่ 2 รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

2.1 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1.1 ผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและไปออรีแอกเตอร์

2.1.2 ส่งเสริมการขยายผลเทคโนโลยีการผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาวโดยจัดทำแปลงพันธุ์ต้นแบบ

2.2 Gantt Chart เปรียบเทียบกิจกรรมที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และกิจกรรมที่ทำจริง

วัตถุประสงค์	กิจกรรม	ช่วงระยะเวลาตามแผน	ช่วงระยะเวลาที่ทำจริง	ข้อชี้แจง
1. ผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและไปออรีแอกเตอร์	1.1 ผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	มิ.ย.-ส.ค.59	มิ.ย.-ส.ค.59	
	1.2 ผลิตขยายต้นพันธุ์ปลอดโรคใบขาวด้วยระบบไปออรีแอกเตอร์จนชั่วครว	ก.ย.-พ.ย.59	สค.-กย.59	
	1.3 การอนุบาลต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวในโรงเรือนปลูกพืชกันแมลง	ธ.ค.59-ม.ค.60	ตค.-พย.59	
2. ส่งเสริมการขยายผล	2.1 การจัดทำแปลง	ก.พ.-ก.ย.60	พย.59-พค.60	

เทคโนโลยีการผลิตอ้อย ปลอดโรคใบขาวโดย จัดทำแปลงพันธุ์ต้นแบบ	พันธุ์หลัก			
	2.2 การชำซ้ออ้อยจาก แปลงพันธุ์หลักสำหรับ ปลูกเป็นแปลงพันธุ์ ขยาย	ต.ค.-พ.ย.60	มีย.-กค.60	
	2.3 อบรมถ่ายทอด องค์ความรู้แก่ เจ้าหน้าที่ และ เกษตรกรนาร่อง	พ.ค.60	มีย.60	

2.3 ตารางเปรียบเทียบ Output ที่เสนอในข้อเสนอโครงการ และที่ได้จริง

กิจกรรมในข้อเสนอโครงการ/หรือจากการปรับแผน	ผลสำเร็จ (%)	ในกรณีล่าช้า (ผลสำเร็จไม่ถึง 100%) ให้ ระบุสาเหตุและการแก้ไขที่ท่านดำเนินการ
1. ได้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พันธุ์ LK92-11 และพันธุ์ ขอนแก่น 3 พันธุ์ละ 1,000 กระจุยกยอด	100	-
2. ได้ต้นพันธุ์ปลอดโรคใบขาวด้วยระบบไบโอรีแอค เตอร์จุ่มชั่วคราว พันธุ์ LK92-11 จำนวน 15,000 ต้น และพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 20,000 ต้น นำ ต้นกล้าอ้อยที่ได้ย้ายปลูกในแปลงพันธุ์หลัก 10 ไร่ แบ่งพื้นที่พันธุ์ละ 5 ไร่	100	-
3. ได้ต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวจากการชำซ้อ อ้อยจากแปลงพันธุ์หลักจำนวน 350,000 ต้น และ มอบให้เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรีที่ เข้าร่วมโครงการจำนวน 15 ราย เพื่อนำไปปลูกใน แปลงพันธุ์ขยาย 1 รวมพื้นที่ 105 ไร่	100	โดยขอขยายเวลาโครงการฯ อีก 2 เดือน (มีย.-กค.60) เพื่อให้อ้อยในแปลงพันธุ์ หลักมีอายุครบ 8 เดือน เหมาะสมกับการ นำมาชำซ้ออ้อย

หมายเหตุ: แสดงรายละเอียดของผลการดำเนินงาน พร้อมสรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้ดำเนินการไปแล้ว [ทั้งนี้ ให้แนบ
บทความ ผลงานความก้าวหน้าทางวิชาการของแผนงานวิจัย/โครงการวิจัย ระหว่างที่ทำการวิจัยที่เคยพิมพ์ในวารสาร
ทางวิชาการแล้วหรือบทความที่จะนำไปเผยแพร่ทางสื่อมวลชนได้ (ถ้ามี)]

2.4 ระบุรายละเอียดที่ได้แก้ไขปรับปรุงตามข้อเสนอแนะของผู้ประเมิน (ถ้ามี)

2.4.1 ได้เตรียมการป้องกันกรณีการย้ายต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวลงปลูกในแปลงพันธุ์หลักพื้นที่ 10 ไร่
และปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย 100 ไร่ มีอัตราการรอดต่ำ และมีโอกาสเป็นโรคจากธรรมชาติสูง โดยการปลูกต้นกล้าที่ได้
จากระบบไบโอรีแอคเตอร์ในสภาพเพาะที่มีหลุมขนาดใหญ่ขึ้นก่อนย้ายลงแปลง (ย้ายจากสภาพเพาะ 200 หลุม ลงสภาพ
เพาะ 50 หลุม) และการชำซ้อจะใช้สภาพเพาะขนาด 21 หลุม

2.4.2 แสดงตัวเลขประกอบภาพและตาราง และจัดกลุ่มงานลักษณะเดียวกันในหน้าเดียวกันในรูปแบบที่ กระชับเข้าใจง่าย

2.5 งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยเป็นเงินทั้งสิ้น 4,610,500 บาท

หมวดงบประมาณ	งบประมาณ	
	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	งบประมาณที่ใช้ไป (บาท)
ก. ส่วนที่โครงการบริหาร		
หมวดค่าตอบแทน	138,000.00	103,500.00
หมวดค่าจ้าง	0	0
หมวดค่าใช้สอย	3,030,000.00	3,044,907.00
หมวดค่าวัสดุ	1,477,000.00	1,462,093.00
ข. ส่วนที่บริหารโดย สกว.		
ค่าใช้จ่ายในการจัดฝึกอบรม	50,000.00	
ค่าอำนวยความสะดวกสถาบัน	200,000.00	
รวม	4,895,000.00	4,610,500.00

2.6 งานตามแผนงานวิจัย/โครงการวิจัยที่จะทำต่อไป-

2.7 คำชี้แจงเกี่ยวกับปัญหา/อุปสรรค และวิธีการแก้ไข (ถ้ามี)-

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะอื่นๆ ต่อ สกว.

- ☒ ประชุมกับนักศึกษา/ผู้ช่วยวิจัย หรือนักศึกษาขอพบเพื่อหารือการทำวิจัย.....12.....ครั้ง
- ☒ ตรวจสอบผลงานวิจัยที่ทำโดยนักศึกษา หรือผู้ช่วยนักวิจัย

(ลงนาม)

(นายรณภพ บรรเจิดเชิดชู)

หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ 30 ตุลาคม 2560

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทสรุปผู้บริหาร	11
บทคัดย่อ (ไทย-อังกฤษ)	12
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	14
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	14
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	15
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	15
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	26
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	66
บรรณานุกรม	67
ภาคผนวก	68

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงข้อมูลของสารสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP	25
2	เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัสของอ้อย 2 พันธุ์ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) หลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 เดือน	26
3	จำนวนขวดที่พบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการส่งต้นมาถึงมหาวิทยาลัยแม่โจ้	34
4	ค่าวิเคราะห์ดินแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน	51
5	ข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน	53
6	ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)	56
7	ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ LK92-11 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)	58
8	รายชื่อและที่ตั้งแปลงเกษตรกรผู้เข้าร่วมโครงการจัดทำแปลงขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อยอต้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 โดยใช้สารละลาย คลอโรกซ์ (ก.) ขึ้นส่วนยอต้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (ข.-ค.) ใบอ่อน (ง.) ปลายยอด (จ.) เนื้อเยื่อเจริญ (ฉ.)	20
2	ลักษณะต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ก่อนเริ่มทำการทดลอง ที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวแบบขวดแผ่ที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล	23
3	ใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 1 เดือน (ก) และ 2 เดือน (ข) ตามลำดับ	26
4	ปลายยอดของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 (ก) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 1 เดือน (ข) และ 2 เดือน (ค) ตามลำดับ	27
5	เนื้อเยื่อเจริญของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 (ก) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) (ข) เป็นเวลา 2 เดือน (ค)	27
6	การเพิ่มปริมาณกระจุกต้นอ้อยพันธุ์ LK 92-11 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล เป็นเวลา 3-4 เดือน	28
7	กระจุกต้นของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ที่ปลอดจากเชื้อโรค เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล เป็นเวลา 3-4 เดือน (ก-ข) ขวดขนาด 8 ออนซ์ หุ้มพลาสติกกันกระแทก (ค) และบรรจุหีบห่อใส่ในกล่องโฟม (ง)	28
8	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 50 ตัวอย่าง และ พันธุ์ LK92-11 จำนวน 20 ตัวอย่าง	30
9	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR ของอ้อยพันธุ์ LK92-11 จำนวน 20 ตัวอย่าง และพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 50 ตัวอย่าง	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 40 ตัวอย่าง และ พันธุ์ LK92-11 จำนวน 35 ตัวอย่าง	32
11	การขนส่งต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพปลอดเชื้อจากกำแพงแสนมายังมหาวิทยาลัยแม่โจ้	33
12	การขนส่งต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในสภาพปลอดเชื้อจากกำแพงแสนมายังมหาวิทยาลัยแม่โจ้	34
13	ลักษณะของต้นอ้อยที่อยู่ในอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงไป	35
14	ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณต้นอ้อยด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวขนาดภาชนะ 700 มิลลิลิตร	36
15	ลักษณะต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแบนที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	37
16	ลักษณะการเกิดรากของต้นอ้อยพันธุ์ 'LK92-11' ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จม ชั่วคราวที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	38
17	ลักษณะการบวมบริเวณฐานของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	38
18	จำนวนรากต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	39
19	ความยาวรากของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	จำนวนใบต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	40
21	ความกว้างใบของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	40
22	ความยาวใบต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	41
23	น้ำหนักสดต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	41
24	น้ำหนักแห้งต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์	42
25	วัสดุปลูกดิน ทราย และซีเถ้ากลบ (ก) ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน (ข) บรรจุใส่ถุงพลาสติก (ค) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (ง) และนำวัสดุปลูกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาผสมรวมกับพีทมอส อัตราส่วน 2:1 (จ และ ฉ)	43
26	บรรจุวัสดุปลูกลงถาดปลูก 200 หลุม (ก) เกลี่ยวัสดุปลูกให้สม่ำเสมอเต็มทุกหลุม (ข) ใช้เทอร์ราคลอร์ ซูเปอร์เอ็กซ์ รดวัสดุปลูกเพื่อฆ่าเชื้อ (ค) และถาดวัสดุปลูกพร้อมปลูกต้นกล้า (ง)	44
27	ต้นกล้าอ้อยที่มีรากพร้อมออกปลูกในภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ (ก) และต้นอ้อยเป็นกอพร้อมทำการคัดแยกต้น (ข)	44
28	การคัดแยกต้นกล้าอ้อยโดยใช้ปลายใบมีดตัดให้หลุดออกจากกัน (ก) และการดึงแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ (ข)	45
29	การตัดแต่งใบบริเวณโคนต้นที่มีม่วงหรือเสียหายออก	45

ภาพที่	สารบัญภาพ (ต่อ)	หน้า
30	นำต้นกล้าอ้อยที่ได้มาคัดขนาดต้น โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามขนาดความสูงต้น	45
31	บรรจุต้นกล้าอ้อยที่คัดขนาดแล้วลงในกล่องพลาสติก (ก) และล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง (ข)	46
32	ต้นกล้าอ้อยขนาดต่างๆ พร้อมย้ายปลูก	46
33	ต้นกล้าอ้อยถูกเตรียมพร้อมก่อนย้ายปลูก (ก และ ข)	46
34	การปลูกต้นกล้าอ้อยลงในถาดปลูกที่มีวัสดุพร้อมปลูก (ก และ ข)	47
35	การรดน้ำต้นกล้าอ้อยหลังย้ายปลูกด้วยถังพ่นน้ำชนิดพ่นฝอย (ก) และต้นกล้าอ้อยที่ให้น้ำแล้ว (ข)	47
36	กระบะสำหรับวางถาดปลูกต้นกล้าอ้อยช่วงการปรับสภาพต้น (ก และ ข)	47
37	การเปิดฝิ่งต้นกล้าอ้อยในตอนเช้า (ก) และให้น้ำแบบระบบพ่นฝอย (ข)	48
38	สภาพแวดล้อมของการปรับสภาพต้นกล้าอ้อยในช่วงที่มีอากาศร้อนและแสงแดดจัด (ก และ ข)	48
39	การเปิดฝารีเมย์ออกเป็นช่องในตอนเย็นภายหลังการย้ายปลูก 5-6 วัน (ก) และ 7-10 วัน (ข) และ 11 วัน เปิดออกทั้งหมด (ค)	48
40	ต้นกล้าอายุ 5 วันหลังย้ายปลูก (ก) และต้นกล้าเจริญเติบโตพร้อมขนส่ง (ข)	49
41	ต้นกล้าอ้อยปรับสภาพได้แล้ว (ก) ทำการตัดแต่งใบ (ข) ต้นกล้าอ้อยโตพร้อมขนส่ง (ค) และการตัดใบ ต้นกล้าอ้อยให้เหลือความสูงประมาณ 22-25 เซนติเมตรก่อนขนส่ง (ง)	49
42	การขนส่งอ้อยหลังจากปลูกในโรงเรือนนาน 2 เดือน	50
43	ย้ายต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวลงถาดเพาะ 50 หลุม (ก) ต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนนาน 1 เดือน (ข)	51

ภาพที่	สารบัญภาพ (ต่อ)	หน้า
44	พื้นที่แปลงพันธุ์หลัก 10 ไร่ ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (ก) เตรียมแปลงโดยการขุดต่อไม้ (ข-ค) ปรับระดับแปลง (ง) ไถและยกร่อง (จ)	52
45	แปลงพันธุ์หลักในการผลิตต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 โดยการปลูกและให้น้ำตามร่องหลังปลูก (ก และ ข) และปลูกซ่อมต้นกล้าที่ตายเนื่องจากน้ำท่วมแปลง (ค และ ง) สภาพแปลงอ้อยอายุ 5 เดือน (จ และ ฉ)	54
46	การชำข้ออ้อยปลอดโรคใบขาวพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ในถาดเพาะขนาด 21 หลุม เพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนกันแมลง (ก-ง) จนต้นกล้าอ้อยอายุ 1.5 เดือน (จ และ ฉ)	55
47	ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)	60
48	ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ LK92-11 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)	61
49	กิจกรรมการอบรม เรื่อง การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว ทั้งภาคบรรยาย (ก) การสาธิตเทคนิค LAMP (ข) และการดูงานการชำข้ออ้อยในโรงเรือนปลูกพืช (ค และ ง)	63
50	ผู้แทนจากฝ่ายวิจัยวิจัยมุ่งเป้า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และผู้แทนจากโรงงานน้ำตาลราชบุรีส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี (ก) การส่งมอบโดยการบรรจุต้นกล้าในถุงพลาสติก (ข) และเกษตรกรขนส่งนำไปปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย (ค)	64
51	พิกัดแปลงเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจัดทำแปลงขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวในจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี และนครปฐม	65

การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว Multiplying technology of white leaf disease free sugarcane production

รณภพ บรรเจิดเชิดชู สุภาพร กลิ่นคง รงรอง หอมหวล และ นพมณี โทบุญญานนท์
Ronnappop Bunjoedchoedchu, Supaporn Klinkong, Rongrong Homhual
and Nopmanee Topoonyanont

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการวิจัย นี้เป็นการวิจัยที่เน้นผลลัพธ์ที่ให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้นจากการได้ผลผลิตอ้อยเพิ่มขึ้นผ่านการรับเทคโนโลยีด้านอ้อยที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ โดยการลดความเสียหายและยับยั้งการแพร่ระบาดของโรคใบขาวในเขตภาคตะวันตกไม่ให้ระบาดรุนแรงและกว้างขวางเช่นเดียวกับภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวเพื่อกระจายให้กับเกษตรกรในเขตภาคตะวันตกเพื่อทดแทนท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อ โครงการนี้เน้นการนำเทคโนโลยีที่มีการพัฒนาแล้วมาขยายผลเพื่อแก้ปัญหาการระบาดของโรคใบขาว เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์พืช ในเชิงอุตสาหกรรมด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว การอนุบาลต้นกล้าในระบบโรงเรือนกันแมลง การตรวจเชื้อด้วยเทคนิคที่มีความไวสูง การใส่สารเคมีกำจัดแมลงไปกับระบบน้ำหยดเพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะในแปลงเป็นต้น และดำเนินการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวผ่านการจัดทำแปลงพันธุ์หลักต้นแบบ ส่งเสริมให้เกษตรกรจัดทำแปลงพันธุ์ขยายอ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการประสานงานกับโรงงานน้ำตาลเครือข่ายในการดูแลรักษาอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ

ผลงานวิจัยที่ได้จาก การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากท่อนพันธุ์อ้อยที่ผ่านการตรวจว่าปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค nested PCR แล้ว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 จากจำนวนชิ้นส่วนที่มาทดลอง พบว่าใบอ่อนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (87.50-91.67%) รองลงมาคือ ปลายยอด (50-58.33%) และเนื้อเยื่อเจริญ (41.67-50%) ตามลำดับ และทำการคัดเลือกกระจุกต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ที่ผ่านการตรวจสอบว่าปลอดจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวแล้ว มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณกระจุกต้นได้พันธุ์ละ 1000 กระจุกต้น เพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณต้นจำนวนมากในอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว ผลจากการเพิ่มปริมาณในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว และนำอ้อยออกปลูกในเรือนโรงควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลานาน 2 เดือน ผลิตได้อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 23,000 ต้น และพันธุ์ LK92-11 จำนวน 20,000 ต้น ผลจากการ นำต้นกล้าอ้อยที่ได้ย้ายปลูกในแปลงพันธุ์หลัก 10 ไร่ แบ่งพื้นที่พันธุ์ละ 5 ไร่ ได้ต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวจากการชำอ้อยจากแปลงพันธุ์หลักจำนวน 350,000 ต้น โดยก่อนส่งมอบดำเนินการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 0.1% จากต้นกล้าทั้งหมด ทางโครงการได้ส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรีที่เข้าร่วมโครงการเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2560 ซึ่งมีเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการและรับมอบต้นกล้าจำนวน 15 ราย มีพิกัดแปลงอยู่ในจังหวัดราชบุรี 10 ราย กาญจนบุรี 3 ราย และนครปฐม 2 ราย รวมพื้นที่ 101 ไร่ แบ่งเป็นพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 52 ไร่ พันธุ์ LK92-11 จำนวน 49 ไร่

บทคัดย่อ

การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากท่อนพันธุ์อ้อยที่ผ่านการตรวจว่าปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค nested PCR แล้ว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 ผลจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนขนาด 0.5 ซม. ปลายยอดขนาดสูง 0.2-0.3 ซม. และเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5-0.7 มม. ในอาหารสูตรทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. และ น้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน แคลลัสขยายขนาดเพิ่มขึ้นและเกาะกันเป็นก้อนมีสีเหลืองอมขาวและเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวจำนวนมาก ขนาดประมาณ 1.50 ซม. 1 ซม. และ 0.5 ซม. ตามลำดับ ผลการตรวจตัวอย่างแคลลัสด้วยเทคนิค nested PCR ที่สุ่มจากอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 40 ตัวอย่าง และ LK92-11 จำนวน 35 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในทุกตัวอย่าง ทำการย้ายกระจุกลงอาหารแข็งที่มีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำไปเพิ่มปริมาณในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อครบ 4 สัปดาห์จะตัดถ่ายจนกระทั่งได้ครบตามที่กำหนด จากนั้นจึงย้ายลงอาหารที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำให้ออกรากเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และนำออกปลูกในเรือนโรงควบคุมอุณหภูมิ โดยนำเลี้ยงในภาตหลุมขนาด 200 หลุมต่อภาตเป็นเวลานาน 2 เดือน นำออกปลูกในแปลงพันธุ์หลัก ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตเมื่ออ้อยอายุ 6 เดือน พบว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11 มีจำนวนหน่อต่อกอ 7.8 และ 5.7 หน่อ ตามลำดับ มีจำนวนตาต่อลำ และความยาวลำ เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน เป็น 18 และ 16 ตาต่อลำ และ 178 และ 194 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตต่อไร่พบว่าพันธุ์ LK92-11 มีผลผลิต 22 ตันต่อไร่ พันธุ์ขอนแก่น 3 มีผลผลิต 18.7 ตันต่อไร่ ผลการเข้าข้ออ้อยอายุ 8 เดือน จากแปลงพันธุ์หลัก และเพาะเลี้ยงในโรงเรือนกันแมลง จำนวน 350,000 ต้น พบว่าพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 มีความงอก 92.32 และ 85.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจากสุ่มตรวจต้นกล้าจำนวน 0.1% ของต้นกล้าทั้งหมดหลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 1.5 เดือน ทางโครงการได้ส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรีจำนวน 15 ราย มีพิกัดแปลงอยู่ในจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี และนครปฐม รวมพื้นที่ 105 ไร่

คำสำคัญ: อ้อย, โรคใบขาว, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, ไบโอรีแอคเตอร์, เทคนิคแลมป์

ABSTRACT

Sugarcane plants of the two commercially grown varieties namely Khon Khen 3 and LK92-11 were produced free from sugarcane white leaf phytoplasma by the tissue culture. Young leaves, 0.5 cm., shoot tips, 0.2-0.3 cm., apical meristem, 0.5-0.7 mm. in size, were cultured on Murashige and Skoog medium (MS) supplemented with 1 mg/L 2,4-D and 10% (v/v) coconut water. Yellowish-white callus developed within 2 months, 1.50 cm., 1 cm. and 0.5 cm., in size respectively. Such callus structures developed green pin-head-sizes structures scattered among the mass of calli. Detection of sugarcane white leaf phytoplasma in 40 calli of Khon Khen 3 and 35 calli of LK92-11 by nested PCR showed negative result suggesting that they were phytoplasma free. The shoot clusters were transferred to MS medium without growth hormone for 2 weeks and subcultured into temporary immersion bioreactor (TIB) in MS medium supplemented with 1 mg/L. BA for 4 weeks and transferred to rooting medium supplemented with 1 mg/L. NAA. After 3 weeks, root plantlets were placed individually in 200 cell plug trays and maintained in greenhouse for 2 months and transplanted in foundation field at Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus for 8 months. At six months after planting showed the number of tillers of variety Khonken 3 and LK92-11 were 7.8 and 5.7 respectively. Comparison of variety Khonken 3 and LK92-11 at an age of 8 months showed that the number of buds per stalk, stalk length and cane yield were 18 and 16 buds per stalk, 178 and 194 cm., 18.7 and 22 ton per rai respectively. About 350,000 seedlings are raised in a greenhouse using single bud setts obtained from foundation field. Germination of variety Khonken 3 and LK92-11 were 92.32 and 85.42% respectively. Detection of sugarcane white leaf phytoplasma in 0.1% of seedlings showed negative result. When the seedlings are of about 6 week old, they were transplanted in the certified fields of 15 Ratburi Sugar Co, Ltd 's farmers. The 105 rai of certified fields are located in the Ratchaburi, Kanchanaburi and Nakhon Pathom.

Keywords: sugarcane, white leaf disease, tissue culture, bioreactor, LAMP technique

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

โรคใบขาวอ้อยมีการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ปลูกอ้อย นับเป็นโรคที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของการผลิตอ้อยในประเทศไทย ในปัจจุบันมีรายงานการระบาดปีละไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านบาท สาเหตุโรคเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งมีการแพร่กระจายของเชื้อโดยการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรคใบขาว และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ จากการขยายกำลังการผลิตอ้อยโดยการเพิ่มพื้นที่ปลูกทำให้เกิดการขาดแคลนท่อนพันธุ์ จึงทำให้เกิดภาวะการขยายท่อนพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นท่อนพันธุ์ที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาแฝงอยู่ข้ามไปยังเขตอื่นและกระจายไปยังทุกแหล่งปลูก ส่งผลให้การแพร่ระบาดของโรคใบขาวเป็นไปอย่างรวดเร็ว และชาวไร่อ้อยส่วนใหญ่มักเก็บอ้อยที่ปลูกส่งโรงงานไว้ใช้ทำพันธุ์ต่อ ทำให้พื้นที่ปลูกอ้อยมีการระบาดเพิ่มขึ้นและขยายวงกว้างขึ้นทุกปี เป็นการสะสมโรคใบขาวเรื้อรังก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในระยะยาว การใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และผ่านกระบวนการอนุบาลต้นกล้าจนถึงการผลิตต้นอ้อยเพื่อใช้เป็นท่อนพันธุ์ปลอดโรคใบขาวในแปลง การตรวจแปลง และการตรวจรับรองแปลงพันธุ์ปลอดโรคใบขาว ร่วมกับการควบคุมแมลงพาหะเพื่อลดการระบาดของโรคใบขาวในแปลง เป็นวิธีการ ในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยที่ได้ผลแบบยั่งยืนในระยะยาวและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป

เทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับระบบการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวได้มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและปัจจุบันได้มีการนำมาใช้อย่างเป็นรูปธรรม ได้แก่

1. การผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
 2. การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปริมาณมาก ๆ ในเชิงอุตสาหกรรมด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว
 3. การอนุบาลต้นกล้าในระบบโรงเรือนกันแมลง
 4. การพัฒนาเทคนิคที่มีความไวสูง (sensitivity) มาใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาปริมาณน้อยๆ ในทุกส่วนของต้นอ้อย เช่น เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) และเทคนิค LAMP (Loop mediated isothermal amplification) เป็นต้น
 5. การพัฒนาการใช้ระบบน้ำหยดในไร่อ้อย ซึ่งสามารถนำมาปรับใช้ในแปลงขยายพันธุ์ปลอดโรคใบขาวโดยการใส่สารเคมีกำจัดแมลงไปกับระบบน้ำเพื่อเป็นการป้องกันการติดเชื้อไฟโตพลาสมาโดยแมลงพาหะในแปลง
- การวิจัยครั้งนี้เป็นการขยายผลของเทคโนโลยีดังกล่าวข้างต้นสู่เกษตรกรผู้ปลูกอ้อย ในการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว และจัดทำแปลงต้นแบบการผลิตขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวร่วมกับการควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานเพื่อลดการแพร่ระบาดของเชื้อไปสู่แหล่งปลูกใหม่ โดยการประสานงานทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชน รวมทั้งสถาบันชาวไร่อ้อย เพื่อแก้ไขปัญหาโรคใบขาวอย่างต่อเนื่องและเกิดผลอย่างจริงจัง

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและไบโอรีแอคเตอร์
- 1.2.2 ส่งเสริมการขยายผลเทคโนโลยีการผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาวโดยจัดทำแปลงพันธุ์ต้นแบบ

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 ดำเนินการวิจัยในเขตภาคตะวันตก โดยคัดเลือกอ้อยพันธุ์ที่นิยมปลูกในเขตภาคตะวันตก ได้แก่ พันธุ์ LK 92-11 และ ขอนแก่น 3 มาขยายพันธุ์ให้ปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (meristematic tissue) และตรวจเชื้อด้วยเทคนิคที่มีความไวสูง (nested PCR หรือ LAMP) ดำเนินการที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

1.3.2 ขยายต้นอ้อยปลอดโรคที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว โดยดำเนินการที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ให้ได้จำนวนต้นอย่างน้อย 50,000 ต้น จากนั้นนำต้นเข้าสู่ระยะยืดยาว และออกรากด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ต้นอ้อยออกรากที่ได้ในสภาพปลอดเชื้อจะนำออกปลูกในโรงเรือนที่มีการควบคุมอุณหภูมิเพื่อปรับสภาพและอนุบาลต้น โดยปลูกในถาดหลุมขนาด 200 หลุม ประมาณ 1 เดือน และส่งกลับไปยังมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.3 ย้ายต้นกล้าลงถาดหลุมขนาด 50 หลุม และอนุบาลต้นกล้าในโรงเรือนปลูกพืชกันแมลงจนต้นกล้าแข็งแรงพร้อมปลูกในแปลงพันธุ์หลัก

1.3.4 จัดทำแปลงพันธุ์หลักในพื้นที่อย่างน้อย 10 ไร่ โดยติดตั้งระบบน้ำหยด และตรวจรับรองแปลงพันธุ์ตามหลักวิชาการ

1.3.5 ขยายพันธุ์อ้อยที่ได้จากแปลงพันธุ์หลักโดยการชำข้ออ้อย และปลูกในโรงเรือนเพาะชำ เพื่อใช้ปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย ในปี 2 ซึ่งจะดำเนินการกระจายต้นกล้าอ้อยสู่แปลงเกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลในเขตภาคตะวันตกโดยการประสานงานกับโรงงานน้ำตาลราชบุรี และตรวจรับรองแปลงพันธุ์ขยายตามหลักวิชาการ

1.3.6 ถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคให้แก่เจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องและชาวไร่อ้อยเพื่อให้เกิดความเข้าใจและให้ความร่วมมือในการจัดการแปลงพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวอย่างถูกต้องและเหมาะสม

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (outputs)
6 เดือนที่ 1	1. ผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2. ผลิตขยายต้นพันธุ์ปลอดโรคใบขาวด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว 3. ย้ายต้นกล้าอ้อยจากถาดเพาะ 200 หลุม (จากมหาวิทยาลัยแม่โจ้) ลงถาดเพาะ 50 หลุม	1. ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พันธุ์ LK92-11 และ ขอนแก่น 3 พันธุ์ละ 1,000 กระจุยกยอด 2. ต้นพันธุ์ปลอดโรคใบขาวขยายด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวในถาดเพาะ 200 หลุม จำนวน 35,000 ต้น 3. ได้ต้นกล้าในถาดเพาะ 50 หลุม จำนวน 700 ถาด
6 เดือนที่ 2	1. อนุบาลต้นกล้าในถาดเพาะ 50 หลุมในโรงเรือนกันแมลงจนต้นกล้าแข็งแรงพร้อมปลูกลงแปลงพันธุ์หลักปลอดโรคใบขาว	1. ได้ต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวที่แข็งแรงพร้อมลงปลูกในแปลงพันธุ์หลักพื้นที่ 10 ไร่

	2.การจัดทำแปลงพันธุ์หลักปลอดโรคใบขาว 3. การชำซั้อ้อยจากแปลงพันธุ์หลักสำหรับปลูกเป็นแปลงพันธุ์ขยาย 4. อบรมถ่ายทอดองค์ความรู้แก่เจ้าหน้าที่และเกษตรกรนำร่อง	2.แปลงพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวตามมาตรฐานแปลงพันธุ์ 10 ไร่ 3. ตันพันธุ์ปลอดโรคใบขาวในฤดูเพาะจำนวน 350,000 ตัน เพื่อปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย 100 ไร่ 4. ถ่ายทอดสู่เกษตรกรเป้าหมายเพื่อผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว 1 ครั้ง ไม่น้อยกว่า 20 คน โดยกลุ่มเป้าหมายเข้าใจกระบวนการผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาว และสามารถนำไปปฏิบัติได้
--	--	---

บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีผนังเซลล์รูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดเล็กประมาณ 200-800 นาโนเมตร จีโนมมีขนาดเล็กตั้งแต่ 530-1350 กิโลเบส (Marcone *et al.*, 1999) จัดอยู่ใน class Mollicutes, order Acholeplasmatales, family Acholeplasmataceae, genus *Candidatus Phytoplasma* เซลล์มีองค์ประกอบของ G+C ของดีเอ็นเอต่ำคือ ประมาณ 23-29 mol% (Kollar and Seemüller, 1989) และยังพบว่าอาศัยอยู่เฉพาะในส่วนของ sieve element ของเซลล์ท่ออาหารพืช และพบในกระเพาะอาหาร น้ำเลือด ต่อม น้ำลาย และส่วนอื่นๆ ที่ใช้ในการเจาะดูดของแมลงพาหะ และอาจเป็นสาเหตุให้แมลงตายก่อนระยะเต็มวัย ส่วนในพืชอาจก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่ซับซ้อนด้วยลักษณะอาการที่เฉพาะ เช่น ดอกเขียว แตกกุ่มฝอย ดอกเป็นหมัน การแตกกุ่มของยอด การยืดยาวของปล้องที่ผิดปกติ อาการเหลือง แคระแกร็น รวมทั้งพบอาการใบขาวในอ้อยและหญ้า (Lee *et al.*, 2000) โรคใบขาวอ้อย มีการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโดยจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรค และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ 2 ชนิด ได้แก่เพลี้ยจักจั่นปีกกลาย (*Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว ชนิด *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura) แนวทางการควบคุมโรคใบขาวอ้อยที่แนะนำกันโดยทั่วไป ได้แก่ การใช้พันธุ์ท่อนพันธุ์สะอาดจากแหล่งที่ไม่มีการระบาด การใช้อ้อยปลอดเชื้อที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การควบคุมแมลงพาหะ การเปลี่ยนเวลาปลูกเพื่อเลี่ยงการติดเชื้อจากแมลงพาหะ การตัดวงจรการระบาดของโรค โดยปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคและแมลงพาหะ การทำลายกออ้อยเป็นโรค เป็นต้น วิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ให้ผลแบบยั่งยืน คือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานโรคใบขาว แต่ยังไม่มียางานถึงความสำเร็จ การป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย ให้ได้ผลเป็นที่ยอมรับในขณะนี้ คือการใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การผลิตอ้อยปลอดโรคจากผลงานวิจัยของรณรงค์ และคณะ (2542) ได้ศึกษาถึงขนาดเนื้อเยื่อเจริญที่เหมาะสมและเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของอ้อยพันธุ์ต่าง ๆ 7 สายพันธุ์โดยศึกษาการใช้อาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 3 มก./ล หรือ 2,4-D 1 มก./ล ร่วมกับน้ำมะพร้าว 10% โดยปริมาตร ในการชักนำให้เกิดแคลลัส หลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 2 เดือน ต้นอ้อยที่ได้มีการซึ่งตรวจสอบโดยใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล ใช้แบบ universal DNA probe (สุภาพร และคณะ 2540) และตรวจผลโดยวิธี dot blot hybridization หลังจากนั้นมีการเพิ่มปริมาณแคลลัสและต้นปลอดโรคต่อไป แต่เนื่องจากระยะแรกของการผลิตอ้อยปลอดโรคจะใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญซึ่งมีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มม. ทำให้ใช้เวลานานประมาณ 2 เดือน เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และต้องใช้เวลาในการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นประมาณ 2 – 3 เดือน ซึ่งมีการพัฒนาเทคนิคโดยนำต้นที่ทดสอบแล้วว่าปลอดโรคจากงานวิจัยมาเป็นต้นแบบสำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ ขั้ว ใบอ่อน ฯลฯ จะช่วยลดระยะเวลาในการผลิตจากการใช้เนื้อเยื่อเจริญโดยตรง นิลุบล และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาประเมินความเป็นไปได้ในการจัดการโรคใบขาวโดยใช้พันธุ์อ้อยปลอดโรค โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดอ่อนของอ้อย และได้ผ่านการตรวจเชื้อสาเหตุโรค ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (nested PCR) ที่ไม่พบเชื้อโรค แล้วนำต้นกล้าย้ายปลูกและอนุบาลในโรงเรือนกันแมลง เมื่อนำไปปลูกในสภาพแปลงปลูกในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในช่วงปี 2549-2554 พบว่า การปลูกพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวห่างจากแปลงอ้อยอื่นๆ 1 กิโลเมตร หรือ มากกว่า สามารถไว้ต้นต่อได้ 3-4 ตอ โดยพบต้นเป็นโรคใบขาวน้อยกว่า 1 %

นอกจากนี้ยังงานวิจัยที่ประยุกต์วิธีการเลี้ยงโดยใช้อาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลว คือวิธีการเลี้ยงแบบจุ่มชั่วคราว (temporary Immersion) นพมณี และคณะ (2549) ได้นำหลักการทำงานของระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบใช้อากาศอัดมาใช้เพาะเลี้ยงต้นพืช โดยใช้ขวดแก้วขนาด 700 มิลลิลิตร เป็นภาชนะบรรจุอาหารเหลวและชิ้นส่วนพืช และใช้นาฬิกาจับเวลาแบบดิจิทัลเพื่อควบคุมการทำงานของวาล์วไฟฟ้าที่จ่ายและระบายอากาศในระบบไบโอรีแอค

เตอร์ และนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบใช้งานเพื่อขยายพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น ปทุมมา หงส์เหิน กล้วย สับปะรด กล้วยไม้ ในปีพ.ศ. 2552 และ 2554 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้สนับสนุนทุนวิจัยแผนงานวิจัยเรื่องระบบการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวขนาดอุตสาหกรรม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำระบบไบโอรีแอคเตอร์ จมชั่วคราวมาผลิตต้นอ้อยให้ได้ในปริมาณมาก ตอบสนองต่อความต้องการต้นอ้อยที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า 1,000,000 ต้นต่อปี ในการวิจัยนี้มีการนำภาชนะพลาสติกขนาดความจุ 20 ลิตร มาใช้เป็นภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ้อยแทนที่จะใช้ขวดแก้วขนาดเล็ก 700 มิลลิลิตร และพัฒนาระบบคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการทำงานของวาล์วไฟฟ้าแทนนาฬิกาจับเวลาแบบดิจิทัล ซึ่งระบบคอมพิวเตอร์สามารถควบคุมการทำงานของไบโอรีแอคเตอร์ จมชั่วคราว ได้อิสระพร้อมกัน จำนวน 8 ชุด ต้นแบบของระบบการผลิตต้นอ้อยในปริมาณมากด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว จากการปฏิบัติงานพบว่าการขยายพันธุ์ต้นอ้อยในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวจะต้องมีการเลือกใช้ภาชนะที่มีขนาดและจำนวนแตกต่างกันให้เหมาะสมกับกระบวนการผลิตในแต่ละช่วง

การตรวจเชื้อ โฟโตพลาสมาที่มีปริมาณน้อยในต้นพืช ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลให้สามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็ว แม่นยำ เชื่อถือได้ ได้แก่ เทคนิค PCR หรือ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อโฟโตพลาสมา ใช้ตรวจยีน 16S rRNA, 16S-23S ITS และ 23S rRNA ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจเชื้อโฟโตพลาสมาทุกชนิด (Lee *et al.*, 1993 and Gundersen *et al.*, 1996) และมีการพัฒนาวิธีเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เทคนิคนี้ได้ช่วยแก้ปัญหาที่สำคัญของเทคนิค PCR คือไม่ต้องใช้เครื่อง PCR เนื่องจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายยีนสามารถเกิดที่อุณหภูมิเดียวคือประมาณ 60-65 องศาเซลเซียส การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อโฟโตพลาสมาได้ดีกว่าเทคนิค PCR ถึง 10 เท่าจึงเป็นวิธีที่เป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจเชื้อได้อย่างจำเพาะ รวดเร็วและตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยๆได้ และ ต่อมา ได้พัฒนาการตรวจเชื้อโฟโตพลาสมาที่พบในพืชตระกูลหญ้ารวมทั้งโรคใบขาวในอ้อยได้สำเร็จด้วยการตรวจยีน *Sec A* (Bekele *et al.*, 2011) ในปีพ.ศ. 2557 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้สนับสนุนทุนวิจัยเรื่องนวัตกรรมการตรวจเชื้อโฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP ด้วยการตรวจยีน 16S rRNA พบว่าเทคนิคที่พัฒนามีความไวในการตรวจเทียบเท่าเทคนิค nested PCR

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 นำท่อนพันธุ์อ้อย(ส่วนยอด)ที่ผ่านการตรวจว่าปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวแล้ว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 (ตรวจด้วยเทคนิค nested PCR ตามวิธีในข้อ 2) มาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวโดยใช้ สารละลายคลอริกซ์ 10% และ 5% ที่เติมสารจับใบ (tween 20) 1-2 หยด แช่นานประมาณ 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นล้างสารละลายคลอริกซ์ออกด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง นำส่วนยอดมาลอกกาบใบแต่ละชั้น ออกจนถึง ใบชั้นใน จากนั้นตัดใบอ่อนให้มี ความยาวประมาณ 0.5 ซม. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. และ น้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) (รณรงค์และคณะ 2542) ซึ่งเป็นสูตร ที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดแคลลัส และต้น

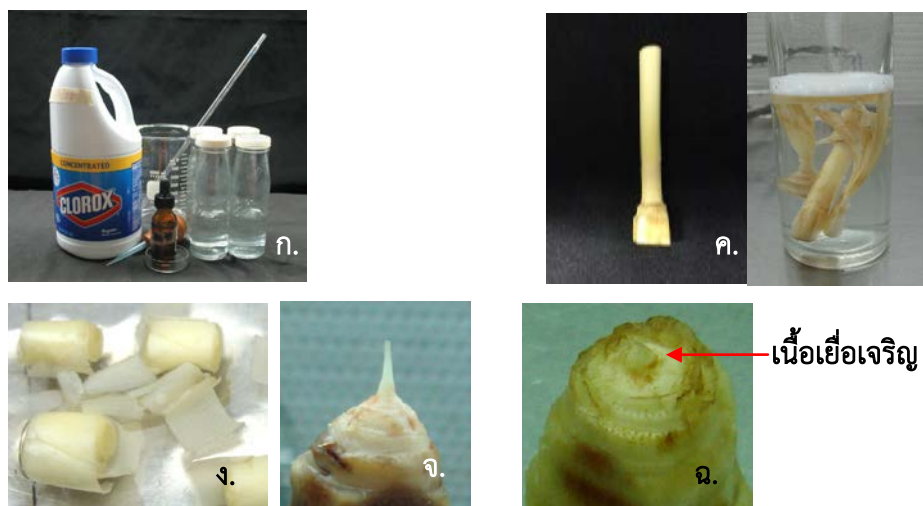
1.2 กรณีการเพาะเลี้ยงยอด ให้ลอกกาบใบอ่อนออกไปจนถึงชั้นในสุดจะเห็นปลายยอดขนาด 0.2-0.3 ซม. ตัดปลายยอดมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.3 กรณีเนื้อเยื่อเจริญ ลอกกาบใบอ่อนจนถึงชั้นในสุดพบปลายยอดที่มีกาบใบหุ้มอยู่ 1 คู่ ลอกกาบใบชั้นใน สุดออกจนถึงเนื้อเยื่อคล้ายโดมมีขนาดเล็กมากส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอชนิดสองตา และตัดเนื้อเยื่อเจริญ ให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5 มม. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1.1

1.4 สังเกตการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนใบอ่อน ยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 1-2 เดือน เก็บเนื้อเยื่อที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 °C ความเข้มแสงประมาณ 13 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

1.5 ตัดใบของกระจุกต้นที่เจริญมาจาก ใบอ่อน ยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญของอ้อย 2 พันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 ที่ได้จากผลการทดลองที่ 1.1-1.4 โดยสุ่มตัวอย่างจากสายพันธุ์ละ 40 ตัวอย่าง มาตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว ด้วยเทคนิค nested PCR อีกครั้ง เพื่อเพิ่มความถูกต้อง แม่นยำ ในการคัดเลือกอ้อยปลอดโรคใบขาว

1.6 การขยายปริมาณแคลลัสและกระจุกยอดในอาหารสูตรทดลองที่ชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก คัดเลือก กระจุกต้น อ้อยทั้ง 2 พันธุ์ที่ ผ่านการตรวจสอบว่า ปลอดจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวแล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเร่งการเจริญเติบโต 6-benzylaminopurin (BA) ความเข้มข้น 2 มก./ล. เพื่อเพิ่มปริมาณกระจุกต้นจำนวนมาก เฉลี่ยพันธุ์ละ 1000 กระจุกต้น โดยเปลี่ยนอาหารทุกเดือนในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 3-4 เดือน เก็บเนื้อเยื่อที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 28 °C ความเข้มแสงประมาณ 37 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ กระจุกต้นใช้เป็น จุดเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณต้นจำนวนมากในอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว



ภาพที่ 1 ขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อยอดอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 โดยใช้สารละลายคลอโรกซ์ (ก.)
ชิ้นส่วนยอดอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (ข.-ค.) ใบอ่อน (ง.) ปลายยอด (จ.) เนื้อเยื่อเจริญ (ฉ.)

2. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค nested PCR

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Dellaporta *et al.*, 1983) โดยมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้ นำตัวอย่างใบอ้อย 0.5 กรัม บดในไนโตรเจนเหลว เติม Extraction buffer (1.4M NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol, 2% PVP-1000, 2% SDS, 2% CTAB) 600 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 600 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.6 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หมุนเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เติม phenol:chloroform (1:1) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส เติม chloroform 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส เติม 3M sodium acetate 0.1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน เติม absolute ethanol 2 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน ตั้งบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer (44.5mM Tris base, 44.5mM boric acid, 1mM EDTA, pH 8.0) ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide solution (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene®) และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา nested PCR ในขั้นตอนต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR

ชนิดไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา

R16mF2/R16mR1 และ R16F2/ R16R2 (Gundersen and Lee, 1996)

ลำดับ	ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	จำนวนเบส (bp)
คู่ที่ 1	R16mF2	CAT GCA AGT CGA ACG GA	17
	R16mR1	CTT AAC CCC AAT CAT CGA	19
คู่ที่ 2	R16F2	ACG ACT GCT GCT AAG ACT GG	20
	R16R2	TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G	25

วิธีการเทคนิค nested PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อยและอ้อยปลูกดีมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 1 ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Dream Taq buffer 2.5 ไมโครลิตร (Fermentas, Ontario, Canada) 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ R16mF2/R16mR1 (10 pmol/μl) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร Dream Taq DNA polymerase (0.1 unit/μl) 0.25 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งขวด 16.25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/μl) 1 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (MJ Research-PT100) ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ในรอบสุดท้าย 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 ด้วยปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการใช้ไพรเมอร์คู่แรก นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3. การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

3.1 การวางแผนการผลิตต้นอ้อย 2 พันธุ์ ตามเวลาที่กำหนด

ทางโครงการต้องการต้นแม่พันธุ์อ้อยที่ปลอดโรคจำนวนทั้งสิ้น 35,000 ต้นที่พร้อมปลูกในแปลง ดังนั้นจึงมีการตกลงที่จะนำต้นพันธุ์อ้อยพันธุ์ 'ขอนแก่น 3' และพันธุ์ 'LK92-11' ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและตรวจความปลอดโรคแล้วและอยู่ในสภาพปลอดเชื้อจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ส่งมายังคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ โดยส่งต้นในสภาพปลอดเชื้อในขวดอาหารแข็ง จากนั้นนำมาขยายพันธุ์เพิ่มด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์เพื่อให้ได้ต้นกล้าอ้อยในถาดพลาสติก 200 หลุม พันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 15,000 ต้น และพันธุ์ LK92-11 จำนวน 20,000 ต้น

3.2 การเพิ่มปริมาณต้นอ้อยด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์

3.2.1 การรับต้นอ้อยในสภาพปลอดเชื้อจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ที่จัดส่งโดยสภาพห้องเย็น ตรวจเช็คสภาพขวดและต้นอ้อยที่ได้รับ ทำการวัดอุณหภูมิภายในกล่องด้วยเทอร์โมมิเตอร์ จากนั้นตรวจเช็คการปนเปื้อนของอาหารที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการขนส่ง

3.2.2 นำต้นที่มาจากขวดที่ไม่เห็นการปนเปื้อนมาตัดเป็นท่อนละ 5 ต้น ย้ายใส่ขวดขนาด 24 ออนซ์ ที่มีอาหารสูตร MS แต่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และใช้สารเพิ่มความแข็งคือ Gelrite เพื่อช่วยให้อาหารใสสามารถสังเกตเห็นการปนเปื้อนชัดเจน ห่อขวดด้วยฟิล์มพลาสติกใส แล้วนำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงพืชที่ควบคุม

อุณหภูมิ 25 ± 2 °C และได้รับแสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวันหลังจากนั้น 2 สัปดาห์ คัดเลือกขวดอาหารที่ใส แสดงว่ามีต้นอ้อยที่ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์นำมาเพิ่มปริมาณต้น นำต้นดังกล่าวมา ตัดปลายใบออกให้กออ้อยสูงประมาณ 3 เซนติเมตร ใน 1 กอมีต้นอ้อยประมาณ 3-5 ต้นแล้วนำกออ้อยจำนวน 25 กอใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงของระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวขนาดภาชนะ 700 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร MS และเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรแล้วนำชุดภาชนะไปต่อเข้ากับชุดควบคุมไบโอรีแอคเตอร์ที่มีการให้อาหารครั้งละ 15 นาที จำนวน 12 ครั้งต่อวัน ต้นที่อยู่ในขวดไบโอรีแอคเตอร์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเฉลี่ยกอละ 3-5 เท้าในระยะเวลา 1 เดือน

3.3 การยืดยาดันอ้อยและการออกรากของต้นอ้อยด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์

หลังจากได้ต้นอ้อยในระยะเพิ่มปริมาณเพียงพอแล้ว นำต้นที่ได้มาชักนำการออกราก ทั้งนี้จากการสังเกตต้นอ้อยที่ได้ในระยะเพิ่มปริมาณที่มีการใช้ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมักไม่เกิดราก และต้นในระยะยืดยาดันที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตรากจะยาวและเส้นเล็กมาก เมื่อทดลองเอาออกปลูกต้นรอดตายต่ำ ดังนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของ NAA ที่เหมาะสมในการเกิดรากของต้นอ้อย

ทำการศึกษาลงของความเข้มข้น NAA ต่อการออกรากของต้นอ้อย สายพันธุ์ ‘LK92-11’ ในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวขนาดภาชนะ 700 มิลลิลิตร วางแผนทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ที่มีการศึกษาความเข้มข้นของ NAA 5 ระดับ ได้แก่ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสิ้น 5 ทรีทเมนต์ๆ ละ 5 ข้วรวมภาชนะระบบไบโอรีแอคเตอร์ที่ใช้ในการทดลองทั้งสิ้น 25 ชุด ระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวนี้อยู่ในห้องเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสง (หลอดฟลูออเรสเซนต์) 14 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการเจริญเติบโตของอ้อย 3 สัปดาห์จากนั้นนำไปออกปลูกในโรงเรือน

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมอาหาร

อาหารที่นำมาใช้ในการทดลอง คือ อาหารเหลวสูตร MS ดัดแปลง ที่มีการเติม NAA 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH 5.8 บรรจุอาหารใส่ในขวดแก้วขนาด 24 ออนซ์ ปริมาตร 350 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมชุดอุปกรณ์ไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว

2.1 ชุดอุปกรณ์จะประกอบด้วยขวด ขนาด 24 ออนซ์ 2 ขวด ซึ่งขวดที่ 1 เป็นขวดสำหรับบรรจุอาหารเหลว และขวดที่ 2 เป็นขวดที่บรรจุชิ้นส่วนพืช

2.2 การประกอบฝา นำฝาเจาะรูที่อยู่ในสภาพเดิมมาใส่ชุดส่งอากาศ แล้วทำการต่อเข้ากับสายซิลิโคน 3 ขนาด โดยสายซิลิโคนเส้นเล็กยาวจะเป็นสายที่ทำหน้าที่ดูดอาหารจากขวดหนึ่งไปยังอีกขวดหนึ่งมีสายซิลิโคนเส้นใหญ่ยาวทำหน้าที่เชื่อมต่อฝาของทั้ง 2 ขวดเข้าด้วยกัน และมีสายซิลิโคนเส้นสั้นซึ่งต่อเข้ากับแผ่นกรองอากาศก่อนเข้าสู่ขวดอาหารและขวดพืชจากนั้นห่อปลายของแผ่นกรองอากาศด้วยแผ่นฟอยล์เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเข้าขณะนึ่งฆ่าเชื้อ

2.3 ชุดอุปกรณ์ในข้อ 2.2 ที่เสร็จแล้วนำไปบรรจุถุงพลาสติก หลังจากนั้นก็นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3. การตัดยาดันอ้อยลงในไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว

นำต้นอ้อยจากอาหารแข็งที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ มาคัดเลือกต้นอ้อยที่ต้นมีความสูงและขนาดใกล้เคียงกัน มาตัดแบ่งเป็นกอๆ ละ 5 ต้น แล้วตัดปลายใบออก ให้ต้นอ้อยมีความสูงประมาณ 3 เซนติเมตรจำนวน 25 กอ กอละ 5 ต้น ต่อการเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์ 1 ชุด (ภาพที่ 2)

ความเข้มข้น NAA (mg/l)	0	0.5	1	1.5	2
ต้นตั้งต้นก่อน การเพาะเลี้ยง					

ภาพที่ 2 ลักษณะต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ก่อนเริ่มทำการทดลอง ที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวแบบขวดแก้วที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล

3.4 การย้ายปลูกต้นอ้อยในโรงเรือนที่ควบคุมอุณหภูมิ

3.4.1 เตรียมวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน ทรายและขี้เถ้ากลบ อัตราส่วน 2:0.5:3 มาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นจึงนำวัสดุปลูกมาผสมรวมกับพีทมอสสำหรับเพาะกล้า ในอัตราส่วน 2:1

3.4.2 นำวัสดุปลูกบรรจุลงถาดปลูกขนาด 36x55 เซนติเมตร มีจำนวนหลุมสำหรับปลูกถาดละ 200 หลุม ทำการเกลี่ยวัสดุปลูกให้สม่ำเสมอเต็มทุกหลุม จากนั้นใช้เทอรากลอร์ ซุปเปอร์เอ็กซ์ ผสมน้ำในอัตราส่วน 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รดวัสดุปลูกเพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง

3.4.3 นำต้นกล้าอ้อยที่มีรากพร้อมออกปลูก ย้ายปลูกลงถาดหลุมและปรับสภาพต้นโดยใช้ผ้ารีเมย์คลุมเพื่อเพิ่มความชื้นให้แก่ต้นอ้อย ดูแลรักษาต้นอ้อยจนกระทั่งต้นโตพร้อมขนส่ง

3.5 การขนส่งต้นอ้อย

ดูแลต้นกล้าอ้อยในโรงเรือนนาน 2 เดือน จึงขนส่งกลับไปยังมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

4. การจัดทำแปลงพันธุ์หลักปลอดโรคใบขาว

4.1 อนุบาลต้นกล้าในโรงเรือนปลูกพืชกันแมลงก่อนปลูกลงแปลง

ย้ายต้นกล้าในถาด 200 หลุม ที่ขนส่งมาจากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ลงถาดหลุมขนาด 50 หลุม โดยการเตรียมวัสดุปลูกเช่นเดียวกับที่ปลูกในถาด 200 หลุม และเพาะเลี้ยงในโรงเรือนเป็นเวลา 1 เดือน จนต้นกล้าแข็งแรงพร้อมปลูกในแปลงพันธุ์หลัก สุ่มเก็บตัวอย่างพันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง (1%) ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP

4.2 การเตรียมแปลงพันธุ์หลัก

4.2.1 คัดเลือกพื้นที่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ไม่เคยปลูกอ้อยมาก่อนจำนวน 10 ไร่ ปรับพื้นที่ แบ่งเป็น 2 แปลงๆ ละ 5 ไร่ ไถและยกร่องให้มีระยะห่าง 1.5 เมตร เก็บตัวอย่างดิน ส่งวิเคราะห์เนื้อดิน และธาตุอาหาร

4.2.2 ติดตั้งระบบน้ำหยด โดยได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานน้ำตาลราชบุรี

4.3 การปลูกและดูแลอ้อยในแปลง

4.3.1 เตรียมต้นกล้าที่จะย้ายปลูกโดยตัดใบให้ต้นกล้าสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ฉีดพ่นสารกำจัดแมลงชนิดดูดซึมก่อนปลูก ปลูกต้นกล้าในร่องให้มีระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ปลูกแล้วให้น้ำตามร่องทันที ปลูกซ่อมต้นที่ตายภายใน 1 เดือน หลังปลูก

4.3.2 การดูแลอ้อยในแปลง

- ฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช หลังปลูก 2 เดือน และ ไถกำจัดวัชพืช หลังปลูก 4 เดือน
- ฉีดพ่นสารกำจัดแมลง หลังปลูก 2 เดือน
- ให้ปุ๋ยสูตร 16-16-16 โรยละ 50 กิโลกรัม จำนวน 2 ครั้ง หลังปลูก 3 และ 5 เดือน
- เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต (ความสูง จำนวนหน่อ) ของอ้อยอายุ 3 และ 6 เดือน
โดยสุ่มในแปลงย่อยขนาด 24 ตารางเมตร จำนวน 3 แปลงย่อยต่อไร่
- เก็บข้อมูลน้ำหนักลำอ้อย และจำนวนตาต่อลำของอ้อยอายุ 8 เดือน
- สำรวจโรคและแมลงในแปลงหลังปลูก 3 และ 6 เดือน

4.3.3 สุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP โดยสุ่มพันธุ์ละ 50 ตัวอย่าง จากหัวแปลง กลางแปลง และท้ายแปลง

5. การขยายพันธุ์อ้อยที่ได้จากแปลงพันธุ์หลักโดยการชำข้ออ้อย

นำท่อนพันธุ์อ้อยอายุ 8 เดือน ที่ได้จากแปลงพันธุ์หลักมาตัดท่อนละ 1 ตา เพาะในภาชนะ ขนาด 21 หลุม โดยใช้วัสดุเพาะ พีทมอส : ขุยมะพร้าว : ไข่ไก่แกลบ : แกลบดิบ อัตราส่วน 1:1:1:1 ให้ได้จำนวนต้นกล้า 350,000 ต้น ปลูกในโรงเรือนกันแมลง และส่งมอบให้เกษตรกรเมื่อต้นกล้าอายุ 1.5 เดือน

สุ่มต้นกล้าจากการชำข้อ นำมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP จำนวน 350 ตัวอย่าง (0.1% จากต้นกล้า 350,000 ต้น)

6. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคLAMP

6.1 ตัวอย่างที่สุ่มตรวจได้แก่

- ต้นกล้าที่ได้จากระบบไบโอรีแอคเตอร์ก่อนนำไปปลูกในแปลงพันธุ์หลักจำนวน 40 ตัวอย่าง (1%)
 - ต้นกล้าจากการชำข้อจำนวน 350 ตัวอย่าง (0.1% จากต้นกล้า 350,000 ต้น)
 - ตัวอย่างอ้อยจากแปลงพันธุ์หลักจำนวน 100 ตัวอย่าง

6.2 ขั้นตอนการตรวจ ดังนี้

6.2.1 ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers) เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอและสารเคมีสำหรับใช้ในปฏิกิริยา LAMP (ตารางที่ 1)

6.2.2 เตรียม reaction mix สำหรับทุกตัวอย่างของแต่ละชุดไพรเมอร์ จากนั้นแบ่งใส่หลอดสำหรับแต่ละตัวอย่างแล้วจึงเติม DNA template เติม mineral oil ปริมาณ 15 ไมโครลิตร ที่ผิวสารละลาย ก่อนนำไปใส่เครื่อง Dry bath โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

Step 1: อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Step 2: อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.2.3 ตรวจสอบด้วยการใช้สารเรืองแสง (SYBR® Green I nucleic acid gel stain) โดยการเติมสารเรืองแสงลงไปในผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (LAMP product) ที่อัตราส่วน 2:25 (V/V) คือสารเรืองแสง 1 ไมโครลิตรใน LAMP product 25 ไมโครลิตร

ตารางที่ 1 ข้อมูลของสารสำหรับการทำปฏิกิริยา LAMP

Reagents	[stock for use]	Volume (μl) /reaction
1. dH ₂ O	-	7.6
2. 10X Thermo polymerase buffer	10X	2.5
3. FIP primer (FIP-16s rDNA-SCLP-ST)	50μM	3.2
4. BIP primer (BIP-16s rDNA- SCLP -ST)	50μM	3.2
5. F3 primer (F3-16s rDNA- SCLP -ST)	50μM	0.2
6. B3 primer (B3-16s rDNA- SCLP -ST)	50μM	0.2
7. MgSO ₄	1M	0.1
8. dNTPs	35mM	1.0
9. Betaine	5M	5.0
10. <i>Bst</i> DNA polymerase	8U/μl	1.0
11. DNA template	-	1.0
Total volume		25 μl

7. การอบรมถ่ายทอดองค์ความรู้แก่เจ้าหน้าที่ และเกษตรกรนาร่อง

จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว” ให้แก่เกษตรกรเครือข่าย และเจ้าหน้าที่โรงงานน้ำตาลราชบุรี เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2560 ณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม เพื่อ ให้ความรู้เกี่ยวกับโรคใบขาวอ้อย และชี้แจงแนวปฏิบัติของเกษตรกรที่จะรับต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวที่ผลิตได้จากโครงการฯ ไปปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย

8. การส่งมอบต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแก่เกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ

ผู้แทนจากฝ่ายวิจัยวิจัยมุ่งเป้า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และผู้แทนจากโรงงานน้ำตาลราชบุรี ส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว ให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรีที่เข้าร่วมโครงการเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2560 โดยเบื้องต้นมอบต้นกล้าไร่ละ 2,500 ต้น เมื่อนำไปปลูกแล้วสามารถมารับเพิ่มเติมได้อีกในกรณีต้นกล้าไม่พอหรือปลูกซ่อม

บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การเพาะเลี้ยงใบอ่อน ยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญของอ้อยจำนวน 2 พันธุ์

1.1 การเพาะเลี้ยงใบอ่อนของอ้อย

หลังจากนำใบอ่อน ยาวประมาณ 0.5 ซม. ของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 ที่ผ่านการตรวจโรคแล้ว มาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) พบว่า อ้อยทั้ง 2 พันธุ์เกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดของแผ่นใบ หรือบนผิวใบ มีลักษณะสีเหลืองอมเขียวหรืออมขาว หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 เดือน มีเปอร์เซ็นต์ จำนวนใบอ่อนที่เกิดแคลลัส และต้นอ่อนตั้งแต่ 87.50-91.67% (ตารางที่ 1) เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมจนครบ เวลา 2 เดือน แคลลัสขยายขนาดเพิ่มขึ้น และเกาะกันเป็นก้อน ขนาดประมาณ 1.50 ซม. มีสีเหลืองอมเขียวและเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวจำนวนมาก (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส ของอ้อย 2 พันธุ์ในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) หลังจากเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 เดือน

เปอร์เซ็นต์/พันธุ์	ขอนแก่น 3	LK92-11
จำนวนใบอ่อนที่เกิดแคลลัส	91.67	87.50
จำนวนปลายยอดที่เกิดแคลลัส	58.33	50.00
จำนวนเนื้อเยื่อเจริญที่เกิดแคลลัส	50.00	41.67



ภาพที่ 3 ใบอ่อนของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 1 เดือน (ก) และ 2 เดือน (ข) ตามลำดับ

1.2 การ เพาะเลี้ยงปลายยอด

เมื่อลอกกาบ ใบอ่อนออกไปจนถึงชั้นในสุดตัดปลายยอดขนาดสูง 0.2-0.3 ซม มาเพาะเลี้ยงในอาหาร สูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) พบว่า เกิดแคลลัสบริเวณฐาน มีลักษณะสีเหลืองอมเขียว ที่รอยตัดบริเวณฐานของปลายยอดของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ปล่อยสารสีน้ำตาล หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 1 เดือน เปอร์เซ็นต์จำนวนปลายยอดที่เกิดแคลลัสตั้งแต่ 50-58.33% (ตารางที่ 1) เมื่อเลี้ยงในอาหารต่อไปเป็น เวลา 2 เดือน เกิดแคลลัสสีเหลืองอมเขียวบริเวณฐานลักษณะแคลลัสเกาะกันเป็นก้อน ขยายขนาดเพิ่มขึ้นความกว้างประมาณ 1 ซม. และเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวบนก้อนแคลลัส (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ปลายยอดของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 (ก) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) เป็นเวลา 1 เดือน (ข) และ 2 เดือน (ค) ตามลำดับ

1.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ

เมื่อลอกกาบใบอ่อนจนถึงปลายยอดชั้นในสุดพบเนื้อเยื่อลักษณะคล้ายโดมมีขนาดเล็กมากส่องดู ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอชนิดสองตา ตัดเนื้อเยื่อเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอให้มีขนาดเล็กประมาณ 0.5-0.7 มม. นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) พบว่า เกิดแคลลัสสีเหลืองอมขาวเจริญล้อมรอบขึ้นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ เปอร์เซ็นต์จำนวนเนื้อเยื่อเจริญที่เกิดแคลลัส 41.67-50% (ตารางที่ 1) เมื่อเลี้ยงจนครบ เวลา 2 เดือน แคลลัสสีเหลืองอม ขาวขยายขนาดเป็นก้อนเพิ่มขึ้น ประมาณ 0.5 ซม. และเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียว (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 เนื้อเยื่อเจริญของอ้อยพันธุ์ LK 92-11 (ก) เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล และน้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) (ข) เป็นเวลา 2 เดือน (ค)

เมื่อเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อน ยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญ ของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนมีการเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดได้เร็วที่สุด ส่วนปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญ เกิดแคลลัสช้ากว่าใบอ่อน และพบว่า เนื้อเยื่อเจริญพัฒนาเกิดแคลลัสได้ช้าที่สุดในอาหารสูตรเดียวกันและเวลาที่เท่ากัน (2 เดือน) เมื่อพิจารณาจำนวนชิ้นส่วนที่มาทดลอง พบว่า จำนวนชิ้นส่วนของใบอ่อนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (87.50-91.67%) รองลงมาคือ ปลายยอด (50-58.33%) และเนื้อเยื่อเจริญ (41.67-50%) ตามลำดับ แคลลัสที่เจริญมาจากเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิดของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ มีความสามารถพัฒนาเกิดยอด และต้นอ่อนได้ใกล้เคียงกัน แคลลัสที่เจริญจากใบอ่อนสามารถผลิต ขยายและเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวได้จำนวนมากและเร็วกว่าแคลลัสที่เจริญมาจากยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญ โดยขนาดของแคลลัสประมาณ 0.2 ซม ที่เลี้ยงในอาหารสูตรทดลองสามารถชักนำให้เกิดกระจุยยอดได้ประมาณ 8-10 ยอด

1.4 การขยาย ปริมาณแคลลัสและกระจุกยอดในอาหารสูตรทดลองที่ชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก

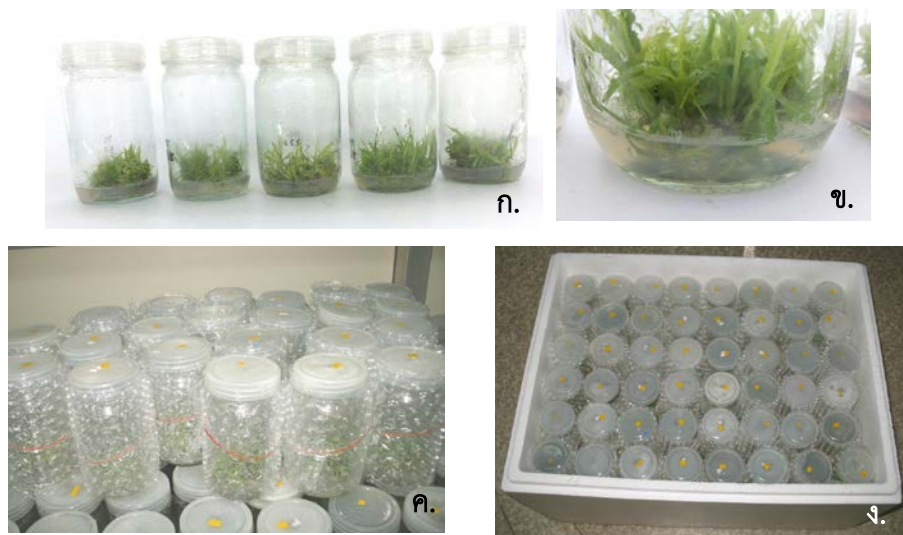
หลังจากคัดเลือกกระจุกต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ คือ ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 ที่ปลอดจากเชื้อโรคไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล พบว่า สามารถขยายปริมาณแคลลัสและแตกกอได้กระจุกต้นจำนวนมากเป็น 3 เท่า ทั้ง 2 พันธุ์ เปลี่ยนอาหารทุกเดือนในอาหารสูตรเดิมเป็นเวลา 3-4 เดือนเพื่อเพิ่มปริมาณกระจุกต้นให้ได้เฉลี่ยพันธุ์ละ 1,000 กระจุกต้น (ภาพที่ 6) เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณต้นจำนวนมากในอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว จากนั้นเตรียมต้นพันธุ์อ้อยทั้ง 2 พันธุ์ ใน ขวด 8 ออนซ์ หุ้มด้วยพลาสติกกันกระแทก จำนวนพันธุ์ละ 384 ขวด รวมทั้งสิ้น 768 ขวด บรรจุในกล่องโฟมเพื่อเตรียมส่งไปเลี้ยงต่อที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (ภาพที่ 7)

สำหรับต้นทุนการผลิตต้นอ้อยที่จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อราคา 15 บาท/ต้น ไม่รวมตรวจสอบ โรคเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว (ณ ปี 2559)

หมายเหตุ อ้างอิงข้อมูลการคำนวณต้นทุนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย (รณรงค์ และคณะ, 2550 เรื่อง การเพาะเลี้ยงปลายยอดอ้อยปลอดโรคและการศึกษาต้นทุนการผลิตในห้องปฏิบัติการ)



ภาพที่ 6 การเพิ่มปริมาณกระจุกต้นอ้อยพันธุ์ LK 92-11 เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล เป็นเวลา 3-4 เดือน



ภาพที่ 7 กระจุกต้นของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ที่ปลอดจากเชื้อโรค เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มก./ล เป็นเวลา 3-4 เดือน (ก-ข) ขวดขนาด 8 ออนซ์ หุ้มพลาสติกกันกระแทก (ค) และบรรจุหีบห่อใส่ในกล่องโฟม (ง)

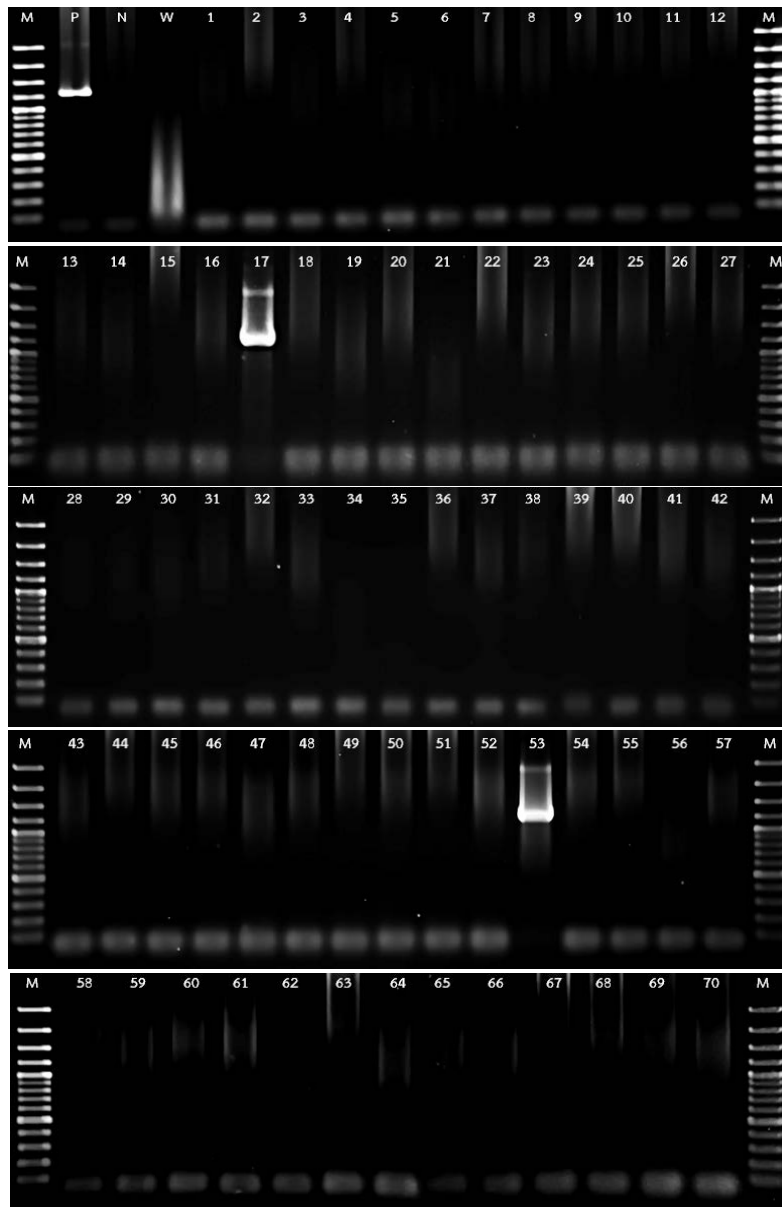
2. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค nested PCR

2.1 การตรวจท่อนพันธุ์อ้อยก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ผลการตรวจตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค nested PCR จำนวน 140 ตัวอย่าง จากพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 100 ตัวอย่าง พบเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวน 4 ตัวอย่าง พันธุ์ LK92-11 จำนวน 40 ตัวอย่าง พบเชื้อไฟโตพลาสมา 1 ตัวอย่าง (ภาพที่ 8 และ 9) นำอ้อยที่ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรทดลองต่อไป

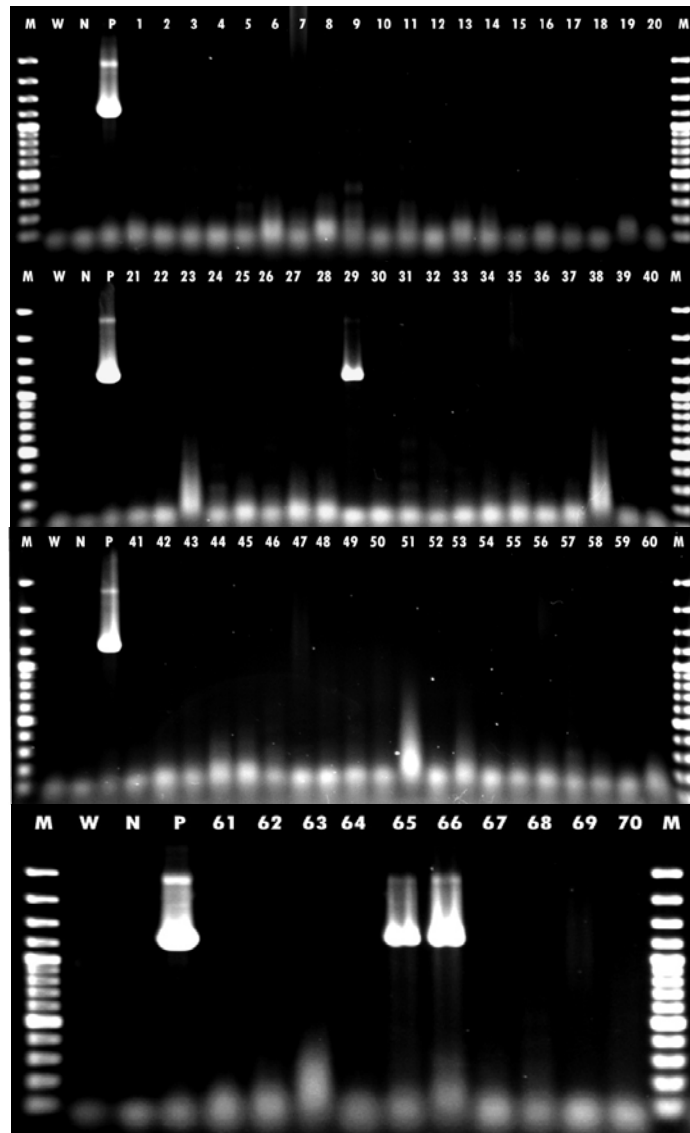
2.2 การตรวจแคลลัส และใบของกระจุกต้นที่เจริญมาจากใบอ่อน ยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญ

ผลการตรวจตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค nested PCR ที่สุ่มจากอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 40 ตัวอย่าง และ LK92-11 จำนวน 35 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในทุกตัวอย่าง (ภาพที่ 10) ซึ่งอ้อยปลอดเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบแล้วทั้ง 2 พันธุ์ ได้นำไปขยายปริมาณในอาหารสูตรทดลองที่ชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก และใช้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณต้นจำนวนมากในอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว



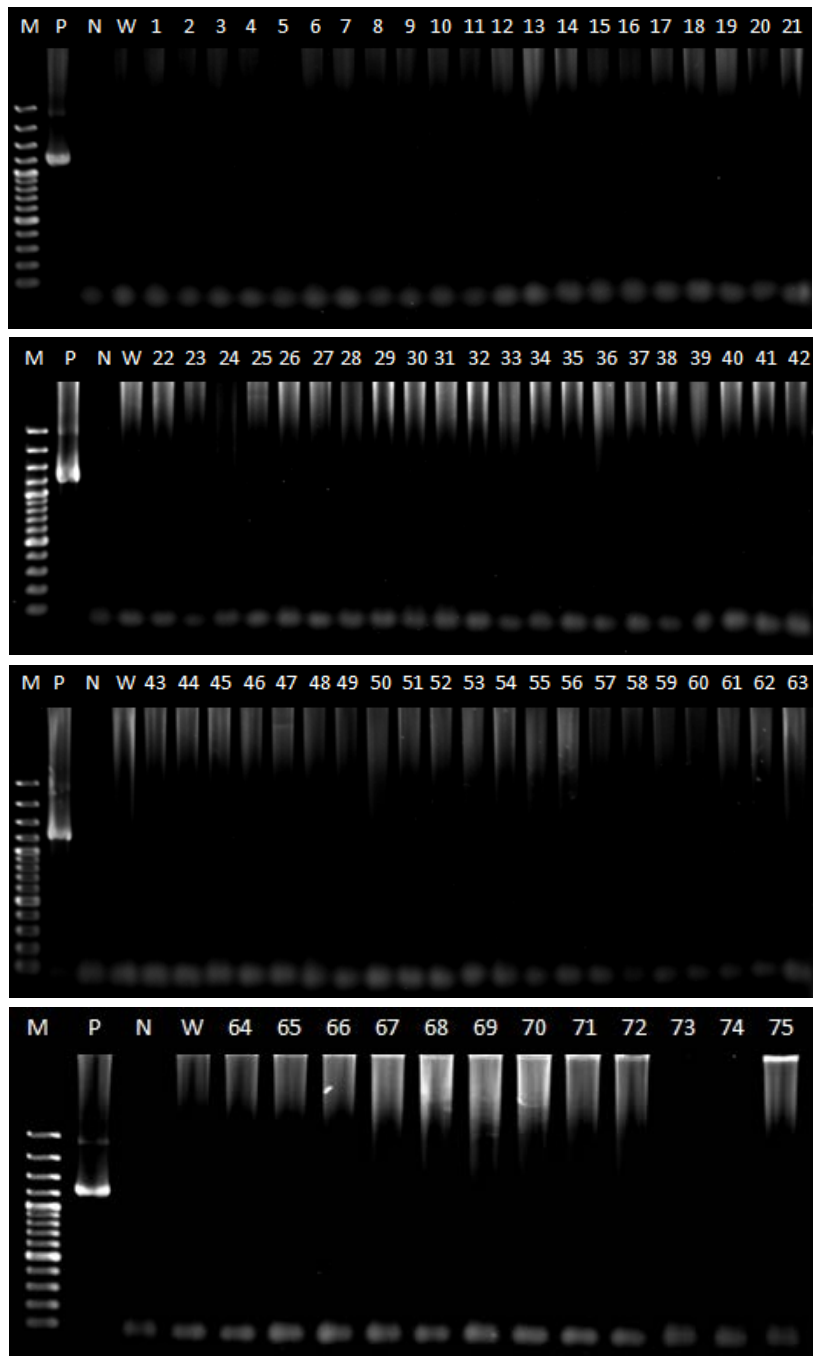
ภาพที่ 8 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
แถบ P	อ้อยเป็นโรคใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา
แถบ N	อ้อยปกติ
แถบ W	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ 1-50	อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3
แถบ 51-70	อ้อยพันธุ์ LK92-11



ภาพที่ 9 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
แถบ W	น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ
แถบ N	อ้อยปกติ
แถบ P	อ้อยเป็นโรคใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา
แถบ 1-20	อ้อยพันธุ์ LK92-11
แถบ 21-70	อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3



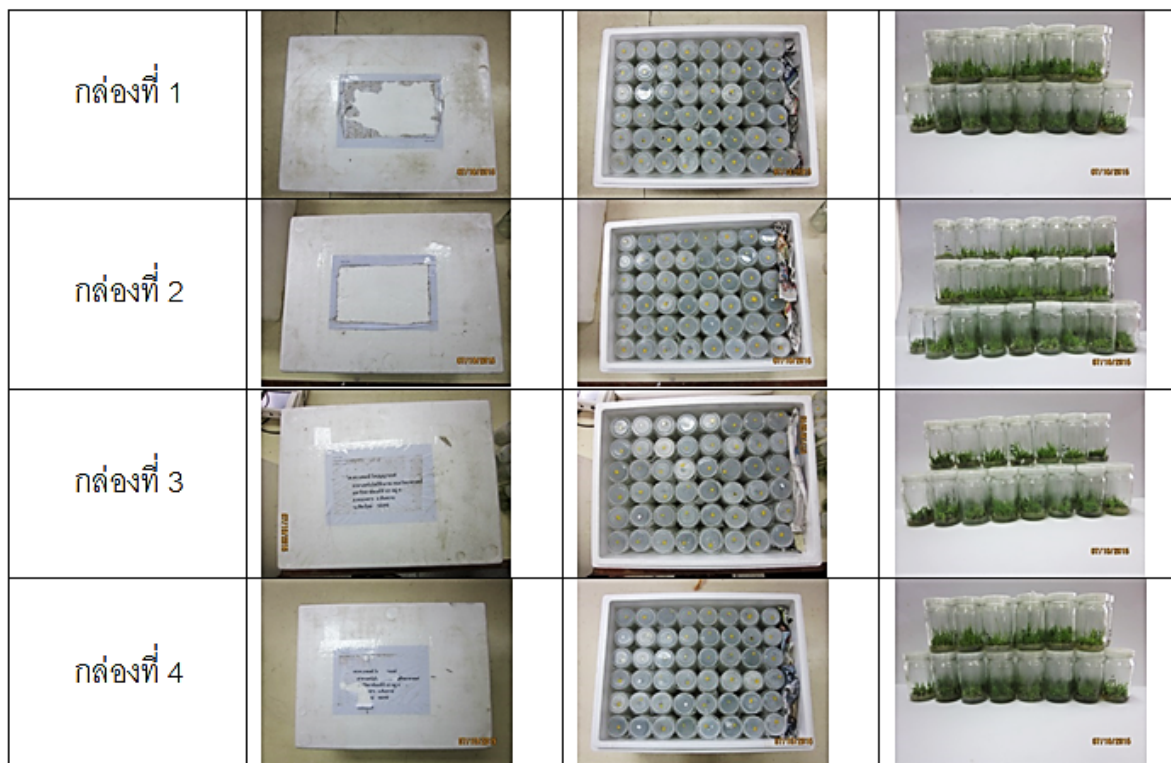
ภาพที่ 10 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,250 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
แถบ P	อ้อยเป็นโรคใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา
แถบ N	อ้อยปกติ
แถบ W	น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ 1-40	อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3
แถบ 41-75	อ้อยพันธุ์ LK92-11

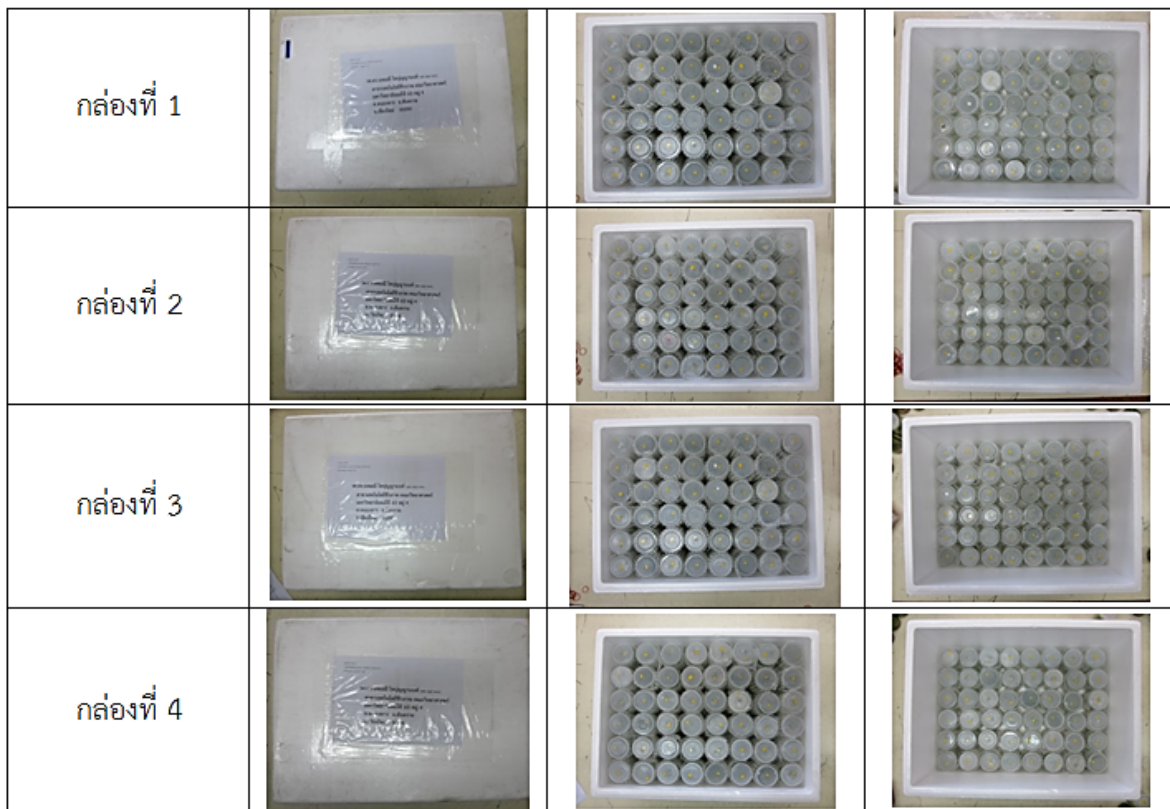
3. การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว

3.1 การรับต้นอ้อยในสภาพปลอดเชื้อจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

ทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้รับอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงในขวด ขนาด 8 ออนซ์ หุ้มด้วยพลาสติกกันกระแทกแล้วบรรจุในกล่องโฟมจำนวนพันธุ์ละ 4 กล่อง กล่องละ 96 ขวด รวมทั้งหมด 768 ขวด (ภาพที่ 11 และ 12) โดยมีการขนส่งมาทางรถห้องเย็นของบริษัทนิมชีเส็ง



ภาพที่ 11 การขนส่งต้นอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในสภาพปลอดเชื้อจากกำแพงแสนมายังมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ภาพที่ 12 การขนส่งต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในสภาพปลอดเชื้อจากกำแพงแสนมายังมหาวิทยาลัยแม่โจ้

3.2 ขั้นตอนการตรวจเช็คสภาพขวดและต้นอ้อยที่ได้รับ

เมื่อได้รับกล่องโฟมแล้ว ทำการวัดอุณหภูมิภายในกล่องด้วยเทอร์โมมิเตอร์ พบว่า อุณหภูมิภายในกล่องเท่ากับ 18-20°C จากนั้นตรวจเช็คการปนเปื้อนของอาหารที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการขนส่งโดยทำการแยกขวดออกตามการเปลี่ยนแปลงของอาหารแข็ง (ตารางที่ 3 และภาพที่ 13) ทั้งนี้ได้สังเกตว่าอาหารมีสีชมพูหรือส้มจางๆ อาหารเป็นวาวตรงบริเวณรอบต้น และอาหารปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียที่เห็นอย่างชัดเจน จำนวนขวดที่เกิดเชื้อรา 64 ขวด จาก 768 ขวด ซึ่งต่ำกว่า 10% ของจำนวนขวดทั้งหมด ขวดที่มีลักษณะเป็นวาวและมีสีส้มนำไปฟอกฆ่าด้วย Clorox 10% นาน 2 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์ต่อไป

ตารางที่ 3 จำนวนขวดที่พบลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการส่งต้นมาถึงมหาวิทยาลัยแม่โจ้

พันธุ์	อาหารปกติ (ขวด)	อาหารสีส้ม (ขวด)	อาหารเป็นวาว (ขวด)	อาหารปนเปื้อน (ขวด)	รวม (ขวด)
ขอนแก่น 3	44	163	124	53	384
LK92-11	233	140	-	11	384
รวม	277	177	124	64	768



อาหารปกติ



อาหารสีชมพูหรือส้ม



อาหารเป็นวาว



อาหารปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

ภาพที่ 13 ลักษณะของต้นอ้อยที่อยู่ในอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงไป

3.3 การเพิ่มปริมาณอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์

กระบวนการผลิตต้นอ้อยในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวนั้น ก่อนนำเอาต้นไปขยายเพิ่มปริมาณในไบโอรีแอคเตอร์ ต้องแน่ใจก่อนว่าต้นไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์แต่อย่างใด หากนำไปใส่ในไบโอรีแอคเตอร์แล้ว ความเสียหายจะรุนแรงกว่าในสภาพอาหารแข็ง จึงต้องนำต้นที่มาจากขวดที่ไม่เห็นการปนเปื้อน (ภาพที่ 14ก) มาตัดเป็นกอๆละ 5 ต้น ย้ายใส่ขวดขนาด 24 ออนซ์ ที่มีอาหารสูตร MS แต่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต และใช้สารเพิ่มความแข็งคือ Gelrite เพื่อช่วยให้อาหารใสสามารถสังเกตเห็นการปนเปื้อนชัดเจน ห่อขวดด้วยฟิล์มพลาสติกใส แล้วนำไปวางไว้ในห้องเพาะเลี้ยงพืชที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C และได้รับแสงสว่างด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ 14 ชั่วโมงต่อวันหลังจากนั้น 2 สัปดาห์ คัดเลือกขวดอาหารที่ใส (ภาพที่ 14ข) แสดงว่ามีต้นอ้อยที่ปราศจากการปนเปื้อน เชื้อจุลินทรีย์นำมาเพิ่มปริมาณต้น ต้นภายในขวดยืดยาวขึ้นเนื่องจากเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต นำต้นดังกล่าวมาตัดปลายใบออกให้อ้อยสูงประมาณ 3 เซนติเมตร ใน 1 กอ มีต้นอ้อยประมาณ 3-5 ต้นแล้วนำกออ้อยจำนวน 25 กอ ใส่ในภาชนะ เพาะเลี้ยงของระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวขนาดภาชนะ 700 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร สูตร MS และเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 14ง) แล้วนำชุดภาชนะไปต่อเข้ากับชุดควบคุมไบโอรีแอคเตอร์ (ภาพที่ 14จ) ที่มีการให้อาหารครั้งละ 15 นาที จำนวน 12 ครั้งต่อวัน ต้นที่อยู่ในขวดไบโอรีแอคเตอร์เพิ่มจำนวนมากขึ้นเฉลี่ยกอละ 3-5 เท่าในระยะเวลา 1 เดือน ทั้งนี้ภาชนะไบโอรีแอคเตอร์ 1 ชุดได้ต้นอ้อยเพิ่มขึ้นสูงถึง 300 ต้นต่อภาชนะ (ภาพที่ 14ฉ) หลังจากได้ต้นอ้อยในระยะเพิ่มปริมาณครบแล้ว นำต้นที่ได้มาชักนำการออกรากต่อไป



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณต้นอ้อยด้วยระบบไบโอริแอกเตอร์จุ่มชั่วคราวขนาดภาชนะ 700 มิลลิลิตร นำต้นที่มาจากขวดที่ไม่เห็นการปนเปื้อน (ก) ย้ายเลี้ยงในขวด ที่มีอาหารสูตร MS แต่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต (ข) นำมาตัดแบ่งใส่ในภาชนะเพาะเลี้ยงของระบบไบโอริแอกเตอร์ จุ่มชั่วคราว ที่มีอาหารสูตร MS และเติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร (ค และ ง) นำชุดภาชนะไปต่อเข้ากับชุดควบคุมไบโอริแอกเตอร์ (จ) ต้นอ้อยเพิ่มจำนวนมากขึ้นเฉลี่ย 3-5 เท่าในระยะเวลา 1 เดือน (ฉ)

3.4 การกระตุ้นการเกิดรากของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11

หลังจากได้ต้นอ้อยในระยะเพิ่มปริมาณเพียงพอแล้ว นำต้นที่ได้มาชักนำการออกราก ทั้งนี้จากการสังเกตต้นอ้อยที่ได้ในระยะเพิ่มปริมาณที่มีการใช้ BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมักไม่เกิดราก และต้นในระยะยืดยาวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตรากจะยาวและเส้นเล็กมาก เมื่อทดลองเอาออกปลูกต้นรอดตายต่ำ ดังนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของ NAA ที่เหมาะสมในการเกิดรากของต้นอ้อย

การผลิตอ้อยพันธุ์ ‘ขอนแก่น3’ เนื่องจากมีการดำเนินการวิจัยแล้วในโครงการวิจัยอื่น เรื่อง ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพต้นพืชบางชนิดที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ จึงได้นำผลการวิจัยดังกล่าวมาขยายผลในระดับอุตสาหกรรมในโครงการนี้เลย ในขณะที่อ้อยพันธุ์ ‘LK-92’ นั้นทางผู้วิจัยยังไม่เคยศึกษาจึงดำเนินการวิจัยเพื่อให้ทราบปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ที่อาจจะแตกต่างไปจากพันธุ์ ‘ขอนแก่น 3’ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการผลิตต้นอ้อยของทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันเท่าใดนัก จึงได้รายงานรายละเอียดเฉพาะพันธุ์ ‘LK-92’

จากการศึกษาความเข้มข้นของ NAA ที่มีผลต่อการออกรากของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแบน ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรดีที่สุด คือต้นยืดยาว มีลำต้นที่สมบูรณ์มีรากที่แข็งแรง

ลักษณะต้นอ้อยหลังเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

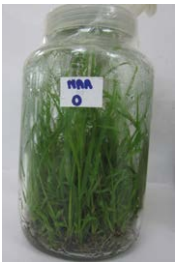
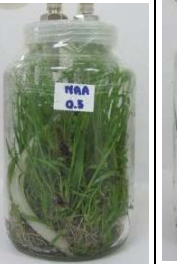
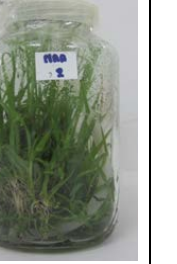
การเพาะเลี้ยงต้นอ้อยในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่เปรียบเทียบความเข้มข้นของ NAA ต่อการออกรากของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 15) พบว่าในแต่ละกล่องของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ต้นอ้อยที่ได้มีขนาดความสูงต้นที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกเป็น 4 ขนาด ได้แก่ ต้นที่น้อยกว่า 3 เซนติเมตร ต้นขนาด 3-5 เซนติเมตร ต้นขนาด 5-8 เซนติเมตร และต้นที่มีขนาดสูงกว่า 8 เซนติเมตร

ขนาดต้น	น้อยกว่า 3 ซม.	ต้น 3-5 ซม.	ต้น 5-8 ซม.	สูงกว่า 8 ซม.
ต้นหลังการเพาะเลี้ยง				

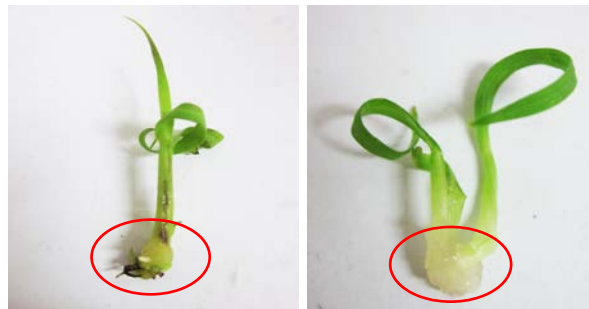
ภาพที่ 15 ลักษณะต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวแบบขวดแบนที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

ลักษณะรากของต้นอ้อยหลังเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

การศึกษาลักษณะของ NAA ต่อการออกรากของอ้อยพันธุ์ LK92-11 หลังเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ (ภาพที่ 16) พบว่า อ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม NAA มีรากเกิดขึ้นน้อย รากมีลักษณะเป็นเส้นบางๆ แต่มีความยาวรากมาก มีสีออกน้ำตาลเล็กน้อย ส่วนต้นที่ได้รับ NAA จะมีจำนวนรากเพิ่มขึ้น รากมีลักษณะสั้นอวบ สีขาว และเมื่อได้รับ NAA ที่สูงขึ้นรากก็จะมีจำนวนมากขึ้นแต่รากจะมีลักษณะสั้นลง จากการสังเกตต้นที่ได้รับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรบางต้น นอกเหนือจากการเกิดรากที่มากขึ้นยังพบว่า บริเวณฐานมีลักษณะบวม คล้ายแคลลัสเกิดขึ้น (ภาพที่ 17)

ความเข้มข้น NAA (mg/l)	0 mg/l	0.5 mg/l	1 mg/l	1.5 mg/l	2 mg/l
หลังเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์					

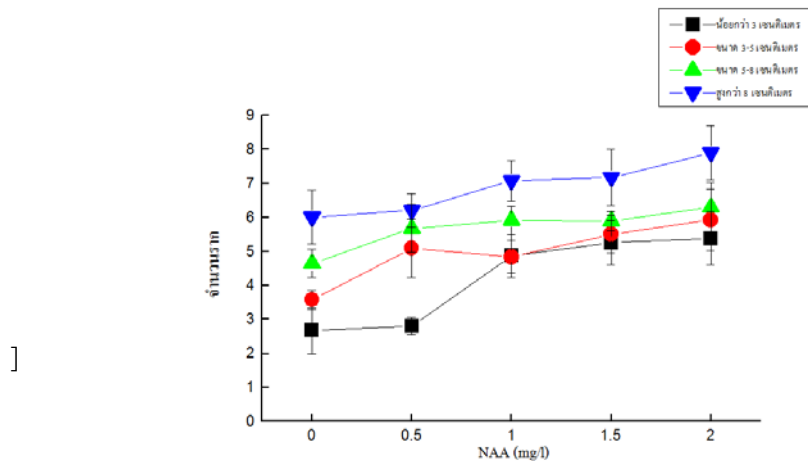
ภาพที่ 16 ลักษณะการเกิดรากของต้นอ้อยพันธุ์ ‘LK92-11’ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์



ภาพที่ 17 ลักษณะการบวมบริเวณฐานของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวที่มีอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

จำนวนรากต่อต้น

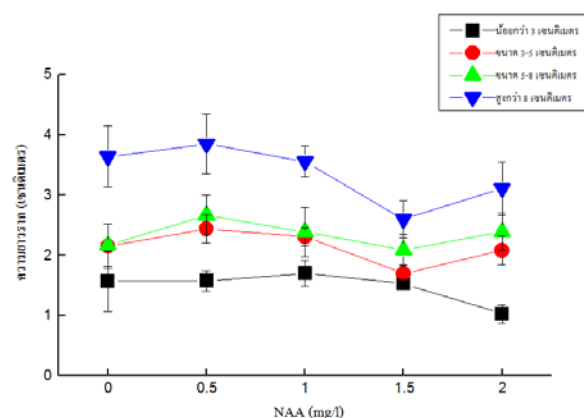
ต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม NAA ให้จำนวนรากสูงกว่าต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติม NAA (ภาพที่ 18) และเห็นได้ว่า เมื่อความเข้มข้นของ NAA สูงขึ้นจำนวนรากเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ต้นที่มีขนาดสูงกว่า 8 เซนติเมตรที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตรมีจำนวนรากเฉลี่ยมากที่สุด คือ 7.90 ราก ส่วนต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA จำนวนรากต่อต้นมีจำนวนรากเฉลี่ยต่ำสุด คือ 6.00 ราก ส่วนต้นที่มีขนาดเล็กกว่า 8 เซนติเมตร มีจำนวนราก 4-6 ราก เมื่อได้รับ NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารที่ไม่มี NAA จำนวนรากเหลือเพียง 2-3 รากเท่านั้น



ภาพที่ 18 จำนวนรากต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จรมข้าวคั่วในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

ความยาวราก

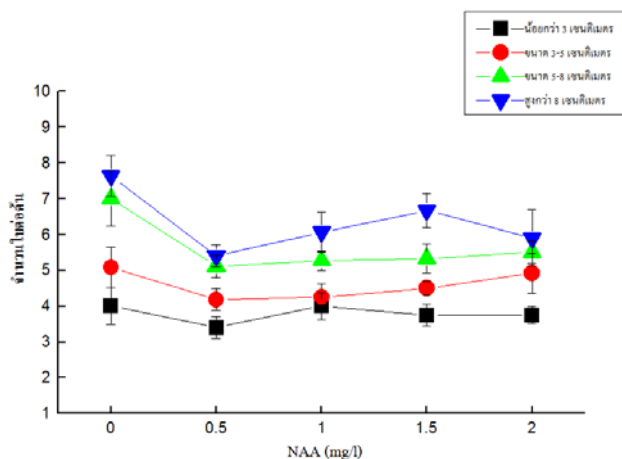
ต้นอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS แต่ละทรีตเมนต์มีรากเกิดขึ้น แต่ความยาวรากจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NAA (ภาพที่ 19) ต้นที่ไม่ได้รับ NAA รากจะยาว และต้นที่ได้รับ NAA รากจะสั้นลงๆ ตามความเข้มข้น NAA ที่เพิ่มขึ้น ลักษณะเช่นนี้เป็นในต้นทุกขนาด ต้นที่มีขนาดเล็กน้อยกว่า 3 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวรากเฉลี่ยต่ำสุด คือ 1.03 เซนติเมตร



ภาพที่ 19 ความยาวรากของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จรมข้าวคั่วในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

จำนวนใบต่อต้น

NAA ไม่มีผลต่อจำนวนใบต่อต้น (ภาพที่ 20) แต่จำนวนใบต่อต้นขึ้นอยู่กับขนาดต้นต้นขนาดเล็กมีจำนวนใบต่อต้นน้อย ส่วนต้นที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจำนวนใบต่อต้นเพิ่มขึ้น ต้นที่สูงกว่า 8 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0-2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนใบเฉลี่ยมากที่สุด คือ 6-7 ใบต่อต้น แต่ต้นขนาดเล็กต่ำกว่า 3 เซนติเมตร มีจำนวนใบต่อต้น 3-4 ใบ

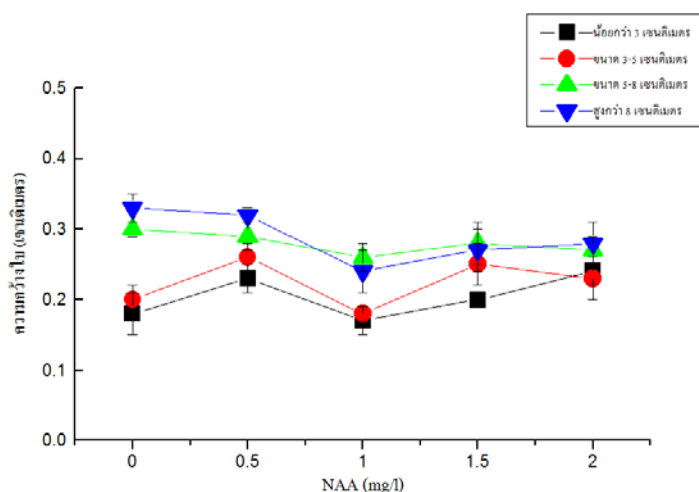


ภาพที่ 20 จำนวนใบต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

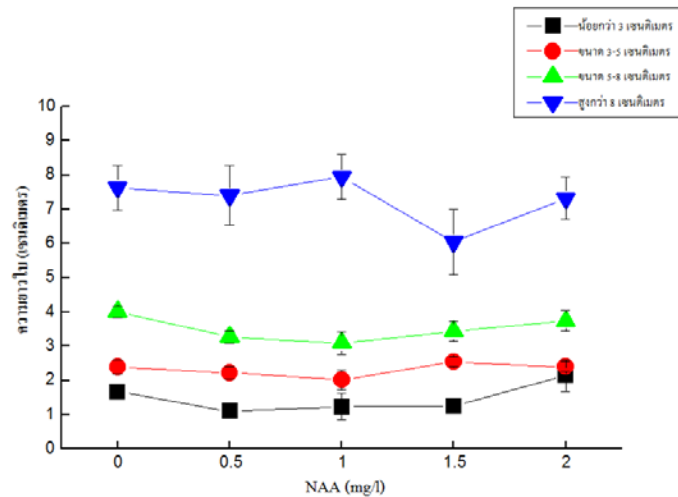
ความกว้างใบและความยาวใบ

จากผลการทดลอง พบว่า ความกว้างใบ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NAA เมื่อความเข้มข้นของ NAA เพิ่มขึ้น ความกว้างใบก็มีขนาดเล็กลง (ภาพที่ 21) ต้นที่สูงกว่า 8 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA มีความกว้างใบเฉลี่ยมากที่สุดคือ 0.33 เซนติเมตร แต่ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความกว้างใบเฉลี่ยเพียง 0.28 เซนติเมตร

ส่วนความยาวของใบอ้อยที่ได้รับ NAA กลับไม่ได้ผลเช่นเดียวกับความกว้างใบ (ภาพที่ 22) ต้นที่ไม่ได้รับ NAA ไม่แตกต่างกับต้นที่ไม่ได้รับ NAA กล่าวคือ ต้นอ้อยที่สูงกว่า 8 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA มีความยาวใบเฉลี่ย 7.63 เซนติเมตร ในขณะที่ต้นที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความยาวใบเฉลี่ย 7.32 เซนติเมตร



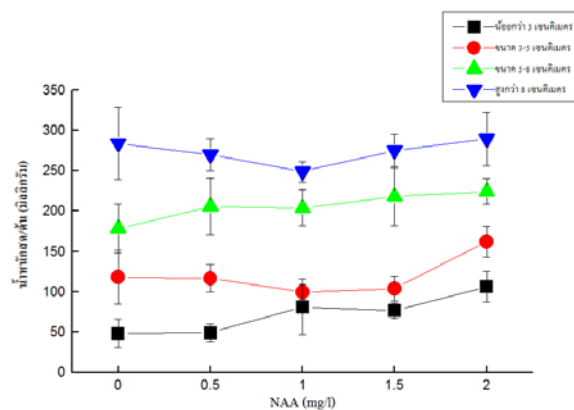
ภาพที่ 21 ความกว้างใบของต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์



ภาพที่ 22 ความยาวใบต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

น้ำหนักสดต่อต้น

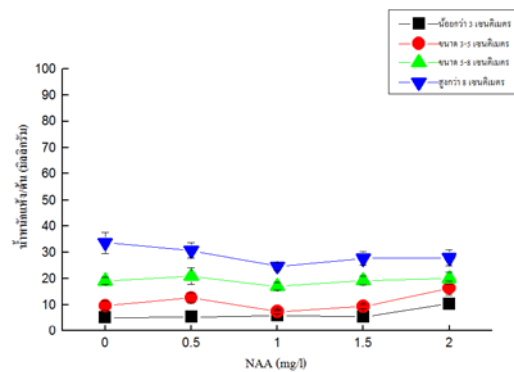
จากภาพที่ 23 จะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของ NAA สูงขึ้น น้ำหนักสดต่อต้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยสังเกตได้จาก ต้นอ้อยที่มีขนาด 5-8 เซนติเมตรที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติม NAA มีน้ำหนักสดต่อต้นเฉลี่ยต่ำสุด คือ 178.75 มิลลิกรัม และเมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร มีน้ำหนักสดต่อต้นเฉลี่ยมากที่สุด คือ 289.65 มิลลิกรัม



ภาพที่ 23 น้ำหนักสดต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราวในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

น้ำหนักแห้งต่อต้น

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งต่อต้นและน้ำหนักสดต่อต้นจะเห็นว่ามีความสัมพันธ์กัน (ภาพที่ 24) เมื่อความเข้มข้นของ NAA สูงขึ้น น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นตาม คือ ต้นที่มีขนาดน้อยกว่า 3 เซนติเมตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมน้ำหนักแห้งต่อต้นเฉลี่ยต่ำสุด คือ 5.22 มิลลิกรัม และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำหนักแห้งต่อต้นเฉลี่ยมากที่สุด คือ 10.45 มิลลิกรัม



ภาพที่ 24 น้ำหนักแห้งต่อต้นอ้อยพันธุ์ LK92-11 ที่เพาะเลี้ยงโดยระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2.0 มก./ล ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์

3.5 การย้ายปลูกต้นกล้าอ้อยจากระบบไบโอรีแอคเตอร์

การย้ายปลูกต้นกล้าอ้อยจากระบบไบโอรีแอคเตอร์ มีขั้นตอนปฏิบัติ ดังนี้

3.5.1 การเตรียมวัสดุปลูก

นำวัสดุปลูกที่มีส่วนผสมของดิน ทราายและขี้เถ้าแกลบ อัตราส่วน 2:0.5:3 มาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นจึงนำวัสดุปลูกมาผสมรวมกับพีทมอสสำหรับเพาะกล้าในอัตราส่วน 2:1 (ภาพที่ 25ก-ง)



ภาพที่ 25 วัสดุปลูกดิน ทราาย และขี้เถ้าแกลบ (ก) ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน (ข) บรรจุใส่ถุงพลาสติก (ค) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (ง) และนำวัสดุปลูกที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาผสมรวมกับพีทมอส ในอัตราส่วน 2:1 (จ และ ฉ)

3.5.2 การเตรียมภาชนะปลูก

นำวัสดุปลูกบรรจุลงภาชนะปลูกขนาด 200 หลุม ทำการเกลี่ยวัสดุปลูกให้สม่ำเสมอเต็มทุกหลุม จากนั้นใช้เทอร์ราคลอร์ ซูเปอร์เอ็กซ์ ผสมน้ำในอัตราส่วน 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รดวัสดุปลูกเพื่อฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง (ภาพที่ 26ก-ง)



ภาพที่ 26 บรรจุวัสดุปลูกลงภาชนะปลูก 200 หลุม (ก) เกลี่ยวัสดุปลูกให้สม่ำเสมอเต็มทุกหลุม (ข) ใช้เทอร์ราคลอร์ ซูเปอร์เอ็กซ์ รดวัสดุปลูกเพื่อฆ่าเชื้อ (ค) และภาชนะวัสดุปลูกพร้อมปลูกต้นกล้า (ง)

3.5.3 การเตรียมต้นอ้อยก่อนปลูก

1) นำต้นกล้าอ้อยที่มีรากพร้อมออกปลูก ออกจากถังชุดเพาะเลี้ยงในระบบไบโอริแอกเตอร์มาล้างด้วยน้ำสะอาดที่ไหลผ่าน 2 ครั้ง แล้ววางในภาชนะคลุมด้วยผ้ารีเมย์ชุ่มน้ำ (ภาพที่ 27ก-ข)



ภาพที่ 27 ต้นกล้าอ้อยที่มีรากพร้อมออกปลูกในภาชนะเพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอริแอกเตอร์ (ก) และต้นอ้อยเป็นกอพร้อมทำการคัดแยกต้น (ข)

2) ทำการคัดแยกต้นกล้าอ้อยออกจากกอ โดยการแกะและดึงแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ และถ้าต้นเกาะกันแน่นมากให้ใช้ปลายใบมีดตัดแยกต้นกล้าอ้อยให้หลุดออกจากกัน (ภาพที่ 28ก-ข)



ภาพที่ 28 การคัดแยกต้นกล้าอ้อยโดยใช้ปลายใบมีดตัดให้หลุดออกจากกัน (ก) และการดึงแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ (ข)

3) ทำการตัดแต่งใบบริเวณโคนต้นที่มีม่วงหรือเสียหายออกเพื่อสะดวกในการย้ายปลูก (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 การตัดแต่งใบบริเวณโคนต้นที่มีม่วงหรือเสียหายออก

4) นำต้นกล้าอ้อยที่ได้มาคัดขนาดต้น โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามขนาดความสูงต้น 4 ขนาด คือ ความสูงต้น <3 เซนติเมตร ความสูงต้น 3-5 เซนติเมตร ความสูงต้น 5- 8 เซนติเมตร ความสูงต้น >8 เซนติเมตร ซึ่งต้องทำการตัดใบออกให้เหลือครึ่งหนึ่งเพื่อสะดวกในการย้ายปลูก และป้องกันการโคนล้มของต้นกล้า (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 นำต้นกล้าอ้อยที่ได้มาคัดขนาดต้น โดยแบ่งเป็นกลุ่มตามขนาดความสูงต้น

5) บรรจุต้นกล้าอ้อยที่คัดขนาดแล้วลงในกล่องพลาสติก กล่องละ 200 ต้น และนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง(ภาพที่ 31ก-ข)



ภาพที่ 31 บรรจุต้นกล้าอ้อยที่คัดขนาดแล้วลงในกล่องพลาสติก (ก) และล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง (ข)

6) ต้นกล้าอ้อยที่ล้างแล้วในกล่องพลาสติกพร้อมขนส่ง เพื่อนำไปย้ายปลูกในโรงเรือน (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 ต้นกล้าอ้อยขนาดต่างๆ พร้อมย้ายปลูก

3.5.4 การย้ายปลูกและการปรับสภาพต้น

1) ต้นอ้อยที่คัดขนาดแล้วพร้อมปลูกลงถาดปลูก (ภาพที่ 33ก-ข)



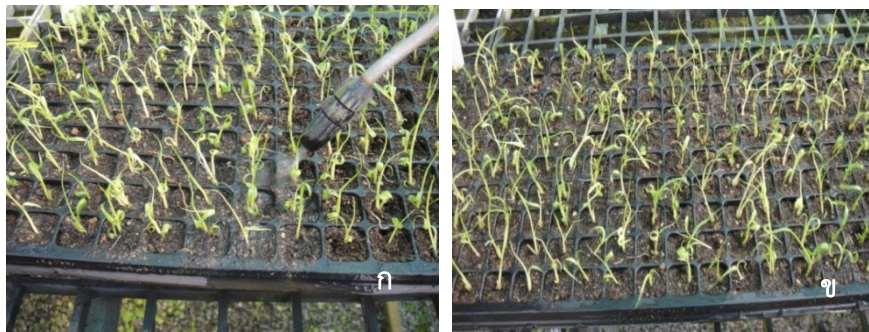
ภาพที่ 33 ต้นกล้าอ้อยถูกเตรียมพร้อมก่อนย้ายปลูก (ก และ ข)

2) ทำการเจาะหลุมปลูกโดยใช้ปากกาหรือแท่งไม้ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ทำหลุมให้กว้างกว่าโคนของต้น เพื่อสะดวกในการปลูก แล้วหย่อนรากต้นอ้อยลงในหลุม จัดเก็บรากให้เรียบร้อย แล้วกลบวัสดุปลูกให้พอดีกับโคนต้น โดยปลูก 1 ต้นต่อ 1 หลุม (ภาพที่ 34ก-ข)



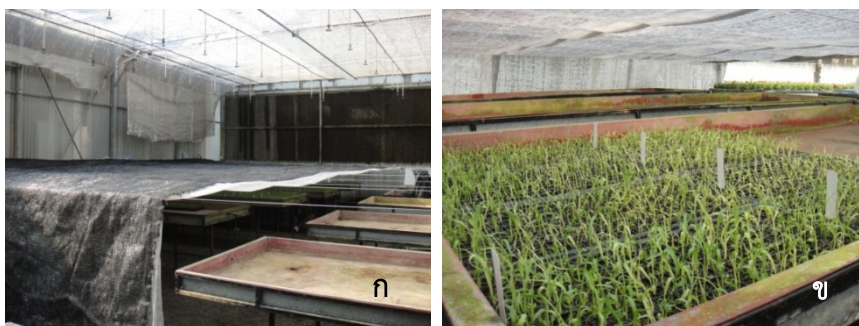
ภาพที่ 34 การปลูกต้นกล้าอ้อยลงในถาดปลูกที่มีวัสดุพร้อมปลูก (ก และ ข)

3) ทำการรดน้ำต้นอ้อยที่ปลูกแล้วด้วยถังพ่นน้ำชนิดพ่นฝอย เพื่อให้วัสดุปลูกจับรากพืช (ภาพที่ 35ก-ข)



ภาพที่ 35 การรดน้ำต้นกล้าอ้อยหลังย้ายปลูกด้วยถังพ่นน้ำชนิดพ่นฝอย (ก) และต้นกล้าอ้อยที่ให้น้ำแล้ว (ข)

4) นำถาดปลูกต้นอ้อยไปไว้บนกระบะเพื่อทำการปรับสภาพต้นโดยใช้ผ้ารีเมย์คลุมเพื่อเพิ่มความชื้นให้แก่ต้นอ้อย แล้วปิดทับผ้ารีเมย์ด้วยซาแลนสีดำที่พรางแสงได้ 70 เปอร์เซ็นต์เพิ่มอีก 1 ชั้น ภายใต้โรงเรือนที่มีการพรางแสงด้วยซาแลน 50 เปอร์เซ็นต์ และในเวลากลางวันที่อุณหภูมิในโรงเรือนสูง จะทำการให้น้ำด้วยระบบพ่นฝอยเป็นครั้งคราว เพื่อเพิ่มความชื้นสัมพัทธ์และลดอุณหภูมิภายในโรงเรือน (ภาพที่ 36ก-ข)



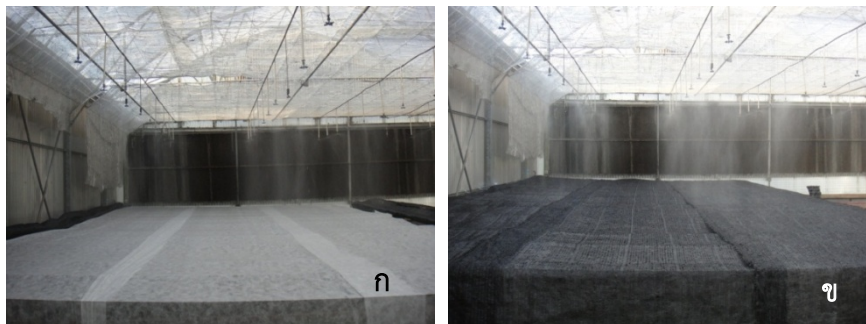
ภาพที่ 36 กระบะสำหรับวางถาดปลูกต้นกล้าอ้อยช่วงการปรับสภาพต้น (ก และ ข)

5) เปิดผึ่งต้นอ้อยในตอนเช้าเพื่อให้ต้นอ้อยค่อยๆ ปรับสภาพและให้น้ำแบบระบบพ่นฝอยเมื่ออากาศร้อน และมีความชื้นสัมพัทธ์ในบรรยากาศต่ำ (ภาพที่ 37ก-ข)



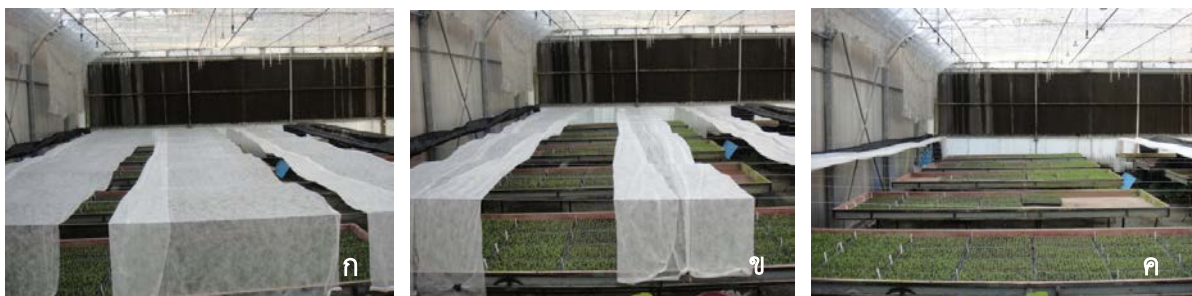
ภาพที่ 37 การเปิดผึ่งต้นกล้าอ้อยในตอนเช้า (ก) และให้น้ำแบบระบบพ่นฝอย (ข)

6) ในเวลากลางวันช่วงที่อากาศร้อน และมีแสงแดดจัดให้คลุมด้วยผ้ารีเมย์ที่ชุ่มน้ำ แล้วตามด้วยชาแลนพรางแสง และให้น้ำแบบระบบพ่นฝอย (ภาพที่ 38ก-ข)



ภาพที่ 38 สภาพแวดล้อมของการปรับสภาพต้นกล้าอ้อยในช่วงที่มีอากาศร้อนและแสงแดดจัด (ก และ ข)

7) ภายหลังจากการย้ายปลูกได้ 5-6 วัน ในตอนเย็นมีการเปิดผ้ารีเมย์ออกเป็นช่องประมาณ 20-25 เซนติเมตร เพื่อให้ต้นกล้าอ้อยปรับสภาพและในวันที่ 7-10 เริ่มเปิดผ้ารีเมย์กว้างขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งวันที่ 11 จะเปิดผ้ารีเมย์ออกทั้งหมด แต่จะปิดทับด้วยชาแลนพรางแสงเฉพาะในช่วงที่แสงแดดจัดเวลาประมาณ 11.00-14.30 น. เท่านั้นและหลังจากวันที่ 14 เป็นต้นไป จะเปิดให้ต้นอ้อยได้รับแสงเต็มที่ (ภาพที่ 39ก-ค)



ภาพที่ 39 การเปิดผ้ารีเมย์ออกเป็นช่องในตอนเย็นภายหลังจากการย้ายปลูก 5-6 วัน (ก) และ 7-10 วัน (ข) และ 11 วัน เปิดออกทั้งหมด (ค)

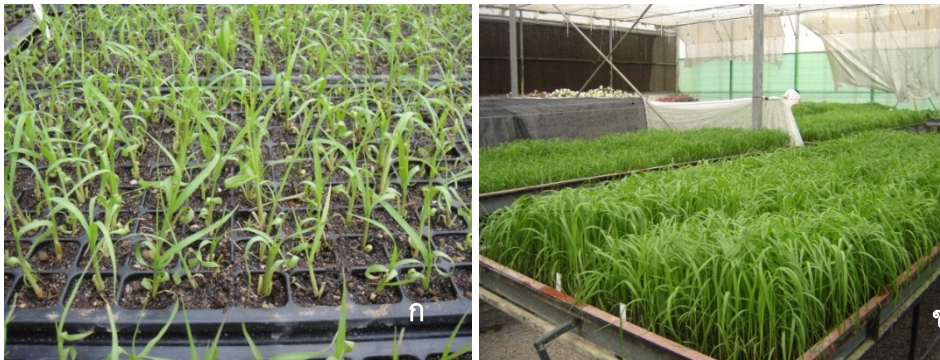
3.6 การดูแลรักษาต้นอ้อย

3.6.1 การให้น้ำ

ทำการให้น้ำหลังปลูกใหม่ๆ ด้วยถังพ่นน้ำชนิดพ่นฝอยในตอนเช้าและตอนบ่าย เมื่อสังเกตว่าหน้าวัสดุปลูกเริ่มแห้ง โดยให้วัสดุปลูกขึ้นแต่ไม่แฉะ และภายหลัง 10 วัน เมื่อต้นตั้งตัวได้แล้วจะให้น้ำเยาะขึ้นในตอนเช้า และสามารถเพิ่มในตอนบ่ายได้เมื่อวัสดุแห้งมากๆ และหากให้น้ำน้อยไม่เพียงพอจะทำให้ใบเหี่ยวเฉาและฟื้นตัวยาก

3.6.2 การให้ปุ๋ย

เมื่อต้นกล้าอายุ 5 วัน หลังย้ายปลูก ให้ปุ๋ยเกร็ดละลายน้ำสูตร 21-21-21 อัตรา 2 ช้อนชาต่อน้ำ 20 ลิตร โดยให้วันเว้นวัน จำนวน 3 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นให้เพิ่มอัตราปุ๋ยสูตรเดิมเป็น 3 ช้อนชาต่อน้ำ 20 ลิตร สัปดาห์ละ 2 ครั้ง และให้ธาตุอาหารเสริมเอพโพธิรอน เอวัน อัตรา 25 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร สัปดาห์ละ 1 ครั้ง จนกระทั่งต้นโตพร้อมขนส่ง (ภาพที่ 40ก-ข)



ภาพที่ 40 ต้นกล้าอายุ 5 วันหลังย้ายปลูก (ก) และต้นกล้าเจริญเติบโตพร้อมขนส่ง (ข)

3.6.3 การตัดแต่งใบ

เมื่อต้นกล้าอ้อยมีอายุ 7 วันหลังปลูก ควรทำการตัดแต่งใบเสีย ใบแห้ง ใบม้วนงอติดวัสดุปลูกทิ้ง เพื่อให้สะดวกในการทำงานและลดการระบาดของโรค และจะทำการตัดแต่งใบทุกๆ 2 สัปดาห์ จนกระทั่งต้นโตพร้อมขนส่งได้ จึงตัดใบทิ้งให้ต้นมีความสูงประมาณ 22-25 เซนติเมตร เพื่อสะดวกต่อการขนส่ง (ภาพที่ 41ก-ง)



ภาพที่ 41 ต้นกล้าอ้อยปรับสภาพได้แล้ว (ก) ทำการตัดแต่งใบ (ข) ต้นกล้าอ้อยโตพร้อมขนส่ง (ค) และการตัดใบต้นกล้าอ้อยให้เหลือความสูงประมาณ 22-25 เซนติเมตรก่อนขนส่ง (ง)

จากนั้นดูแลในโรงเรือนนาน 2 เดือน จึงขนส่งอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 23,000 ต้น และพันธุ์ LK92-11 จำนวน 20,000 ต้น รวมส่งอ้อยทั้งหมด 43,000 ต้น (ภาพที่ 42) เพื่อนำไปปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน



ภาพที่ 42 การขนส่งต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวหลังจากปลูกในโรงเรือนนาน 2 เดือน เพื่อนำมาปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

4. การจัดทำแปลงพันธุ์หลักปลอดโรคใบขาว

4.1 อนุบาลต้นกล้าในโรงเรือนปลูกพืชกันแมลงก่อนปลูกลงแปลง

ผลการย้ายต้นกล้าในถาด 200 หลุม ที่ขนส่งมาจากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ลงถาดหลุมขนาด 50 และเพาะเลี้ยงในโรงเรือนเป็นเวลา 1 เดือน ต้นกล้ามีความสูงประมาณ 45 เซนติเมตร (ภาพที่ 43)



ภาพที่ 43 ย้ายต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวลงถาดเพาะ 50 หลุม (ก) ต้นกล้าที่เพาะเลี้ยงในโรงเรือนนาน 1 เดือน (ข)

4.2 การเตรียมแปลงพันธุ์หลัก

4.2.1 ที่ตั้งแปลงพันธุ์หลักอยู่ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เป็นแปลงที่ไม่เคยปลูกอ้อยมาก่อน จำนวน 10 ไร่ (ภาพที่ 44) ปรับพื้นที่ และไถ ยกร่อง แบ่งเป็น 2 แปลงๆ ละ 45 แถว ผลการวิเคราะห์ดิน (ภาคผนวกที่ 1) พบว่าเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย มีสภาพเป็นด่างเล็กน้อย ดินมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำหรือไม่มีปัญหาดินเค็ม มีปริมาณอินทรีย์วัตถุปานกลาง มีปริมาณฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ค่อนข้างต่ำ มีปริมาณโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้สูง มีปริมาณแคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้สูง และมีปริมาณแมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ปานกลาง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ค่าวิเคราะห์ดินแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

รายการวิเคราะห์		ค่าวิเคราะห์	
เนื้อดิน	(Texture)	Sandy Clay Loam	ดินร่วนเหนียวปนทราย
อนุภาคขนาดทราย (%)	(Sand; %)	52.2	
อนุภาคขนาดทรายแป้ง (%)	(Silt; %)	24.6	
อนุภาคขนาดดินเหนียว (%)	(Clay; %)	23.3	
พีเอชดิน (pH ดิน:น้ำ, 1:1)	(pH Soil:H ₂ O;1:1)	7.48	ด่างเล็กน้อย
ค่าสภาพการนำไฟฟ้า (เดซิเมน/เมตร)	(EC _e ; dS/m)	3.07	ไม่เค็ม
อินทรีย์วัตถุในดิน (%)	(Organic matter;%)	1.76	ปานกลาง
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (มก./กก.)	(Avail.P; mg/kg)	8.88	ค่อนข้างต่ำ
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก.)	(Exch.K; mg/kg)	90.6	สูง
แคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก.)	(Exch.Ca; mg/kg)	552.5	สูง
แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก.)	(Exch.Mg; mg/kg)	89.6	ปานกลาง



ภาพที่ 44 พื้นที่แปลงพันธุ์หลัก 10 ไร่ ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (ก) เตรียมแปลง โดยการขุดต่อไม้ (ข-ค) ปรับระดับแปลง (ง) ไถและยกร่อง (จ)

4.3 การปลูกและดูแลอ้อยในแปลง

4.3.1 ปลูกต้นกล้าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ในแต่ละแปลง พันธุ์ละ 45 แถว โดยปลูกในร่องให้มีระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ใช้ต้นกล้าอ้อยพันธุ์ละ 10,800 ต้น ปลูกแล้วให้น้ำตามร่องทันที (ภาพที่ 45 ก และ ข) อัตราการรอดตายของต้นกล้าอ้อยหลังปลูก 2 สัปดาห์ 90.3% แต่หลังจากปลูกประมาณ 4-6 สัปดาห์ ฝนตกและน้ำท่วมบางส่วนทำให้ต้นกล้าตาย และได้ทำการปลูกซ่อมจนเต็มพื้นที่ (ภาพที่ 45 ค และ ง) และได้ทำการติดตั้งระบบน้ำหยดให้น้ำแปลงอ้อยในช่วงอ้อยอายุ 5 เดือน เป็นต้นไป (ภาพที่ 45 จ และ ฉ)

4.3.2 ผลการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงพันธุ์หลักพบว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีการแตกกอและเจริญเติบโตดีกว่าพันธุ์ LK92-11 เมื่ออ้อยอายุ 6 เดือน มีจำนวนหน่อต่อกอ 7.8 และ 5.7 หน่อ ความสูง 165 และ 135 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน พันธุ์ LK92-11 มีความสูง 194 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีความสูง 178 เซนติเมตร แต่พันธุ์ขอนแก่น 3 มีจำนวนตาดอกลำ 18 ตา มากกว่าพันธุ์ LK92-11 ซึ่งมีจำนวน 16 ตาดอกลำ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตต่อไร่พบว่าพันธุ์ LK92-11 มีผลผลิต 22 ตันต่อไร่ พันธุ์ขอนแก่น 3 มีผลผลิต 18.7 ตันต่อไร่ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

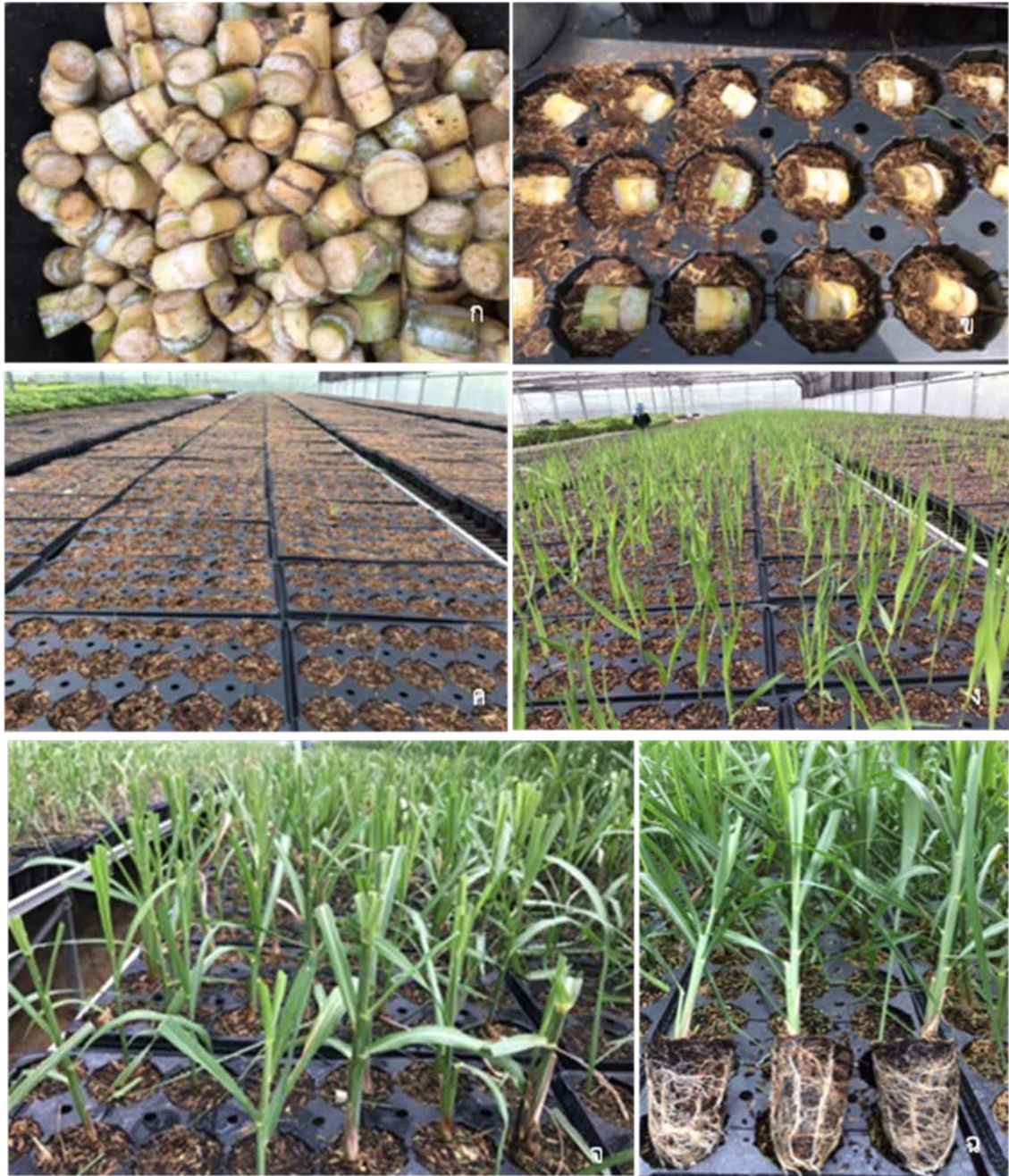
ข้อมูลการเจริญเติบโต	พันธุ์ขอนแก่น 3	พันธุ์ LK92-11
จำนวนหน่อ/กอ (6 เดือน)	7.8	5.7
ความสูง (ซม.) (3 เดือน)	80	66
ความสูง (ซม.) (6 เดือน)	165	135
ความสูง (ซม.) (8 เดือน)	178	194
จำนวนตา/ลำ (8 เดือน)	18	16
น้ำหนักเฉลี่ย/ลำ (กรัม) (8 เดือน)	935	1,102
น้ำหนักเฉลี่ย/2,000 ลำ หรือ 1 ไร่ (ตัน) (8 เดือน)	18.7	22.0



ภาพที่ 45 แปลงพันธุ์หลักในการผลิตต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวพันธุ์มอนแทน 3 และ LK92-11 โดยการปลูกและให้น้ำตามร่องหลังปลูก (ก และ ข) และปลูกซ่อมต้นกล้าที่ตายเนื่องจากน้ำท่วมแปลง (ค และ ง) สภาพแปลงอ้อยอายุ 5 เดือน (จ และ ฉ)

5. การขยายพันธุ์อ้อยที่ได้จากแปลงพันธุ์หลักโดยการชำข้อ

การชำข้ออ้อยอายุ 8 เดือน จากแปลงพันธุ์หลัก และเพาะในถาดเพาะขนาด 21 หลุม เลี้ยงไว้ในโรงเรือนกันแมลง จำนวน 350,000 ต้น พบว่าพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 มีความงอก 92.32 และ 85.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 1.5 เดือน ได้ต้นที่สมบูรณ์พร้อมส่งมอบเกษตรกร คิดเป็น 89.65 และ 76.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 46)



ภาพที่ 46 การชำข้ออ้อยปลอดโรคใบขาวพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ในถาดเพาะขนาด 21 หลุม เพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนกันแมลง (ก-ง) จนต้นกล้าอ้อยอายุ 1.5 เดือน (จ และ ฉ)

6. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค LAMP

6.1 ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างที่สุ่มตรวจได้แก่

- ต้นกล้าที่ได้จากระบบไบโอรีแอคเตอร์ก่อนนำไปปลูกในแปลงพันธุ์หลักจำนวน 40 ตัวอย่าง (1%)
- ต้นกล้าจากการชำซื้อจำนวน 350 ตัวอย่าง (0.1% จากต้นกล้า 350,000 ต้น)
- ตัวอย่างอ้อยจากแปลงพันธุ์หลักจำนวน 100 ตัวอย่าง

6.2 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจากแปลงพันธุ์หลัก โดยการสุ่มพันธุ์ละ 50 ตัวอย่าง ให้รหัสตัวอย่างเป็นตัวเลขตัวแรก หมายถึง แถว ตัวเลขตัวที่สอง หมายถึงลำดับต้นจากหัวแปลง (ท) ท้ายแปลง (ท) กลางแปลง (ก) ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (ตารางที่ 6 และภาพที่ 47) และพันธุ์ LK92-11 (ตารางที่ 7 และภาพที่ 48)

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยการเติมสารเรืองแสง
1	ขก. 2-5 (ท)	-
2	ขก. 3-5 (ท)	-
3	ขก. 3-10 (ท)	-
4	ขก. 5-81 (ก)	-
5	ขก. 5-82 (ก)	-
6	ขก. 6-90 (ก)	-
7	ขก. 6-91 (ก)	-
8	ขก. 8-5 (ท)	-
9	ขก. 9-5 (ท)	-
10	ขก. 9-10 (ท)	-
11	ขก. 11-5 (ท)	-
12	ขก. 12-5 (ท)	-
13	ขก. 12-10 (ท)	-
14	ขก. 14-81 (ก)	-
15	ขก. 14-82 (ก)	-
16	ขก. 15-90 (ก)	-
17	ขก. 15-91 (ก)	-
18	ขก. 17-5 (ท)	-
19	ขก. 18-5 (ท)	-
20	ขก. 1 -10 (ท)	-
21	ขก. 20-5 (ท)	-
22	ขก. 21-5 (ท)	-
23	ขก. 21-10 (ท)	-
24	ขก. 23-81 (ก)	-
25	ขก. 23-82 (ก)	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยการเติมสารเรืองแสง
26	ขก. 25-90 (ก)	-
27	ขก. 25-91 (ก)	-
28	ขก. 26-5 (ท)	-
29	ขก. 27-5 (ท)	-
30	ขก. 27-10 (ท)	-
31	ขก. 29-5 (ท)	-
32	ขก. 30-5 (ท)	-
33	ขก. 30-10 (ท)	-
34	ขก. 32-81 (ก)	-
35	ขก. 32-82 (ก)	-
36	ขก. 33-90 (ก)	-
37	ขก. 33-91 (ก)	-
38	ขก. 35-5 (ท)	-
39	ขก. 36-5 (ท)	-
40	ขก. 36-10 (ท)	-
41	ขก. 38-5 (ท)	-
42	ขก. 39-5 (ท)	-
43	ขก. 39-10 (ท)	-
44	ขก. 41-81 (ก)	-
45	ขก. 41-82 (ก)	-
46	ขก. 42-90 (ก)	-
47	ขก. 42-91 (ก)	-
48	ขก. 44-5 (ท)	-
49	ขก. 45-5 (ท)	-
50	ขก. 45-10 (ท)	-
51	P = อ้อยเป็นโรคใบขาว	+
52	N = อ้อยปกติ	-
53	W = น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ	-

หมายเหตุ :

- + พบการเปลี่ยนแปลงของสารเรืองแสง
- ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารเรืองแสง

ตารางที่ 7 ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ LK92-11 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)

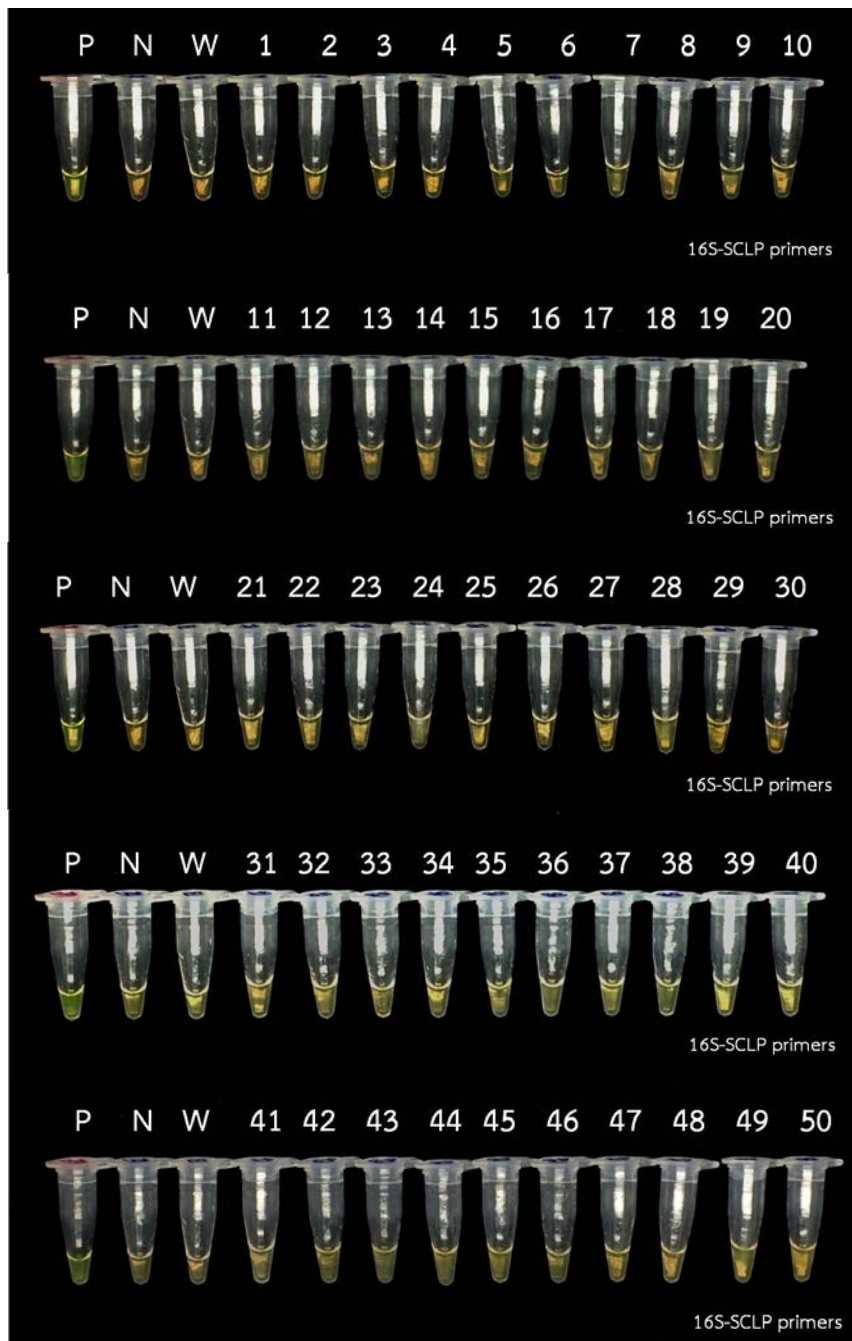
ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยการเติมสารเรืองแสง
1	LK2-5 (ท)	-
2	LK3-5 (ท)	-
3	LK3-10 (ท)	-
4	LK5-81 (ก)	-
5	LK5-82 (ก)	-
6	LK6-90 (ก)	-
7	LK6-91 (ก)	-
8	LK8-5 (ท)	-
9	LK9-5 (ท)	-
10	LK9-10 (ท)	-
11	LK11-5 (ท)	-
12	LK12-5 (ท)	-
13	LK12-10 (ท)	-
14	LK14-81 (ก)	-
15	LK14-82 (ก)	-
16	LK15-90 (ก)	-
17	LK15-91 (ก)	-
18	LK17-5 (ท)	-
19	LK18-5 (ท)	-
20	LK18-10 (ท)	-
21	LK20-5 (ท)	-
22	LK21-5 (ท)	-
23	LK21-10 (ท)	-
24	LK23-81 (ก)	-
25	LK23-82 (ก)	-
26	LK24-90 (ก)	-
27	LK24-91 (ก)	-
28	LK26-5 (ท)	-
29	LK27-5 (ท)	-
30	LK27-10 (ท)	-
31	LK29-5 (ท)	-
32	LK30-5 (ท)	-
33	LK30-10 (ท)	-
34	LK32-81 (ก)	-
35	LK32-82 (ก)	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วยการเติมสารเรืองแสง
36	LK33-90 (ก)	-
37	LK33-91 (ก)	-
38	LK35-5 (ท)	-
39	LK36-5 (ท)	-
40	LK36-10 (ท)	-
41	LK38-5 (ท)	-
42	LK39-5 (ท)	-
43	LK39-10 (ท)	-
44	LK41-81 (ก)	-
45	LK41-82 (ก)	-
46	LK42-90 (ก)	-
47	LK42-91 (ก)	-
48	LK44-5 (ท)	-
49	LK45-5 (ท)	-
50	LK45-10 (ท)	-
51	P = อ้อยเป็นโรคใบขาว	+
52	N = อ้อยปกติ	-
53	W = น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ	-

หมายเหตุ :

- + พบการเปลี่ยนแปลงของสารเรืองแสง
- ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสารเรืองแสง



ภาพที่ 47 ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)

P : อ้อยเป็นโรคใบขาว

N : อ้อยปกติ

W : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

1-50 : ตัวอย่างอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3



ภาพที่ 48 ผลการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยพันธุ์ LK92-11 จากแปลงพันธุ์หลักด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์เพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA (16S-SCLP primers)

P : อ้อยเป็นโรคใบขาว

N : อ้อยปกติ

W : น้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ

1-50 : ตัวอย่างอ้อยพันธุ์ LK92-11

7. การอบรมถ่ายทอดองค์ความรู้แก่เจ้าหน้าที่ และเกษตรกรนำร่อง

จัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง “การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว” ให้แก่เกษตรกรเครือข่าย และเจ้าหน้าที่โรงงานน้ำตาลราชบุรี เมื่อวันที่ 6 มิถุนายน 2560 ณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อ ให้ความรู้เกี่ยวกับโรคใบขาวอ้อย และชี้แจงแนวปฏิบัติของเกษตรกรที่จะรับต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวที่ผลิตได้จากโครงการฯ ไปปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย (ภาพที่ 49)

ผลการดำเนินงาน

7.1 กำหนดการโครงการอบรมฯ

- 9.00 - 11.00 น. บรรยาย : เทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว
โดย รศ.สุภาพร กลิ่นคง
- 11.00- 12.00 น. สาธิต: เทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
โดย อ.ชมากร ภูวิธกรณ์
- 12.00 - 13.00 น. พักรับประทานอาหารกลางวัน
- 13.00 - 15.00 น. ดูงาน: การชำอ้อยในโรงเรือนปลูกพืช
- 15.20 - 16.30 น. สรุปและอภิปรายผล

7.2 กิจกรรมการอบรมฯ

ภาคบรรยาย : ให้ความรู้เกี่ยวกับโรคใบขาวอ้อย ทั้งสาเหตุโรค การแพร่ระบาด และแนวทางการควบคุมโรค และชี้แจงเกี่ยวกับโครงการวิจัย การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว รวมทั้งแนวปฏิบัติของเกษตรกรที่จะรับต้นพันธุ์อ้อยของโครงการฯ ไปปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย

การสาธิต: อธิบายวิธีการตรวจเชื้อสาเหตุโรคใบขาวด้วยวิธีต่างๆ และสาธิตการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค LAMP

การดูงาน: ดูงานการชำอ้อยในโรงเรือนปลูกพืช ได้แก่ การตัดชำอ้อย การผสมวัสดุเพาะ วิธีการวางข้อตาในถาดเพาะ การให้ปุ๋ย และการเตรียมต้นกล้าก่อนปลูกลงแปลง

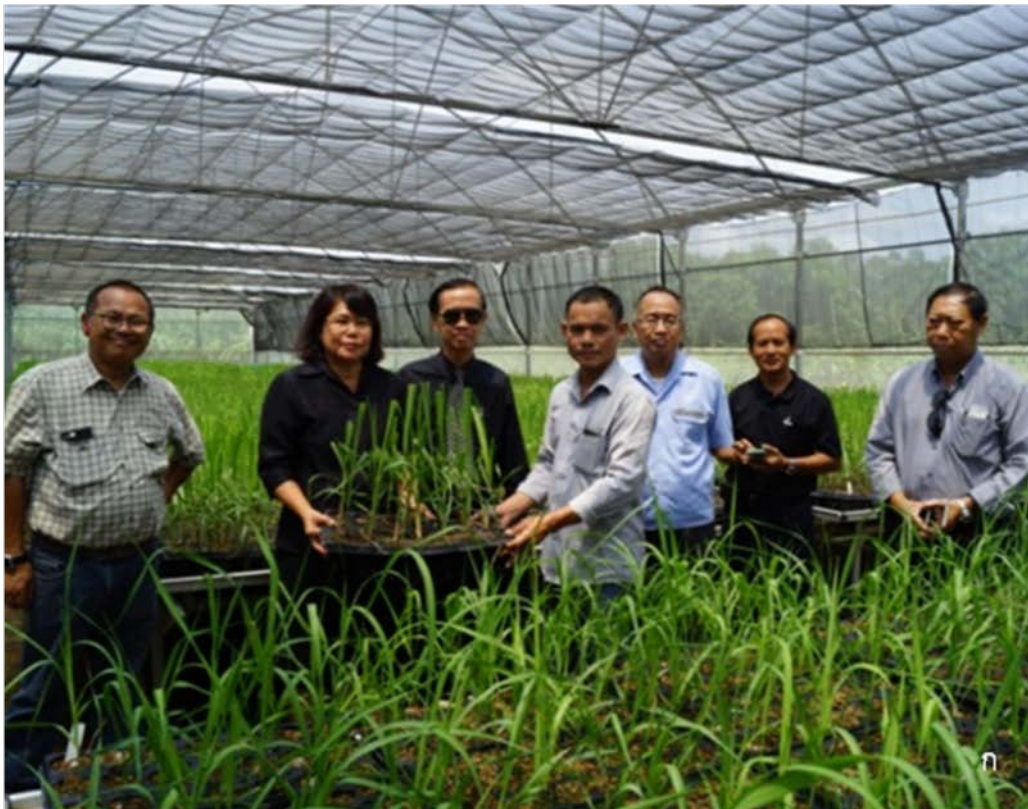
สรุปและอภิปรายผล มีเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจัดทำแปลงพันธุ์ขยายอ้อยปลอดโรคใบขาวจำนวน 19 ราย และพื้นที่แปลงพันธุ์ขยายรวม 125 ไร่ (ภาคผนวกที่ 2) โดยจะนัดวันกับเกษตรกรเพื่อรับมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวเมื่อต้นกล้าครบกำหนดย้ายปลูกลงแปลงพันธุ์ขยายต่อไป โดยทางโครงการจะประสานงานกับโรงงานน้ำตาลราชบุรีในการมอบต้นกล้ากับเกษตรกรทุกราย



ภาพที่ 49 กิจกรรมการอบรม เรื่อง การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว ทั้งภาคบรรยาย (ก) การสาธิตเทคนิค LAMP (ข) และการดูงานการชำอ้อยในโรงเรือนปลูกพืช (ค และ ง)

8. การส่งมอบต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวแก่เกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ

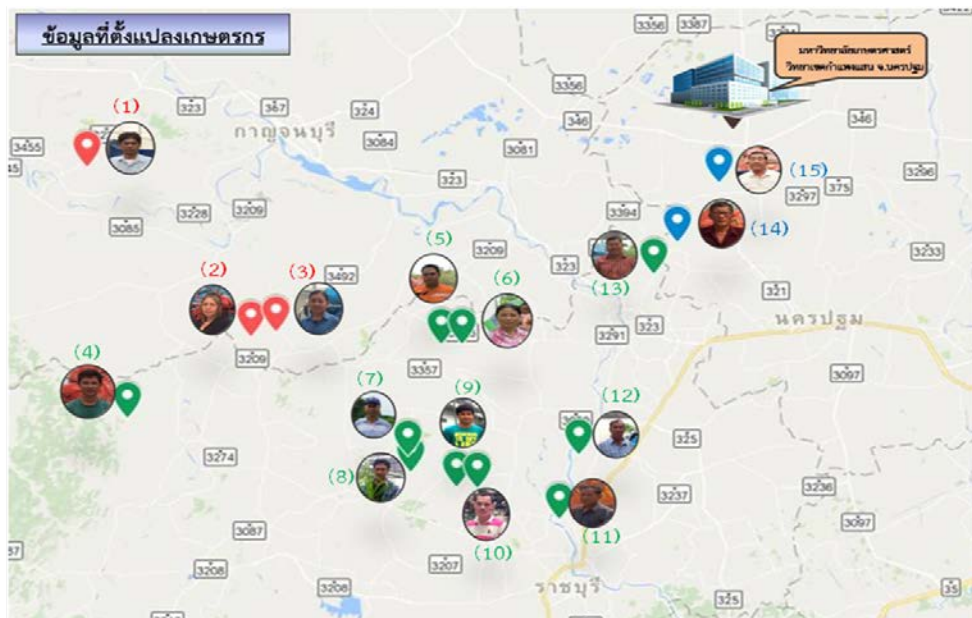
ผู้แทนจากฝ่ายวิจัยวิจัยมุ่งเป้า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และผู้แทนจากโรงงานน้ำตาลราชบุรี ส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาว ให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรีที่เข้าร่วมโครงการเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2560 (ภาพที่ 50) ซึ่งมีเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการและรับมอบต้นกล้าจำนวน 15 ราย มีพื้นที่ปลูกอยู่ใน จังหวัดราชบุรี 10 ราย กาญจนบุรี 3 ราย และนครปฐม 2 ราย (ภาคผนวกที่ 3) เป็นพื้นที่ 105 ไร่ แบ่งเป็นพันธุ์ ขอนแก่น 3 จำนวน 54 ไร่ พันธุ์ LK92-11 จำนวน 51 ไร่ การส่งมอบโดยการบรรจุต้นกล้าในถุงพลาสติก และ เกษตรกรขนส่งนำไปปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย (ตารางที่ 8 และภาพที่ 51) การมอบต้นกล้าในเบื้องต้นมอบต้นกล้าไร่ละ 2,500 ต้น เมื่อนำไปปลูกแล้วสามารถมารับเพิ่มเติมได้อีกในกรณีต้นกล้าไม่พอหรือปลูกซ่อม



ภาพที่ 50 ผู้แทนจากฝ่ายวิจัยวิจัยมุ่งเป้า สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และผู้แทนจากโรงงานน้ำตาลราชบุรี ส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี (ก) การส่งมอบโดยการบรรจุต้นกล้าในถุงพลาสติก (ข) และเกษตรกรขนส่งนำไปปลูกในแปลงพันธุ์ขยาย (ค)

ตารางที่ 8 รายชื่อและที่ตั้งแปลงเกษตรกรผู้เข้าร่วมโครงการจัดทำแปลงขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว

ชื่อ - สกุล	โคกดำ	พันธุ์อ้อย/ไร่		ที่ตั้งแปลง	พิกัดแปลง	
		KK	LK		X	Y
1. นายสนาน นิยม	1000	10	10	ต.บ้านเก่า อ.เมือง จ.กาญจนบุรี	13.0534762	99.1544773
2. น.ส.ลัดดา เข้มทอง	775	3	2	ต.หนองตากยา อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	13.79954	99.49875
3. น.ส.มยุรี เข้มทอง	725	3	2	ต.หนองตากยา อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี	13.805009	99.52336
4. นายภาณุข ตั้งกิตติกุล	594	5	10	ต.ด่านทับตะโก อ.จอมบึง จ.ราชบุรี	13.71135	99.37739
5. นายพิชัย เนียมทอง	807	3	2	ต.เขาขลุ่ย อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	13.79127	99.68750
6. นายชมพู กันนะ	706	4	2	ต.เขาขลุ่ย อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	13.79153	99.70795
7. นายวน นุชพันธ์	780	4	2	ต.ธรรมเสน อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	13.67022	99.65398
8. นายสราวุธ เนียมเตี้ย	451	4	2	ต.ธรรมเสน อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	13.65215	99.65635
9. นายพรพจน์ พันธุ์ไทย	423	3	2	ต.ปากช่อง อ.จอมบึง จ.ราชบุรี	13.63724	99.70294
10. นายชูเกียรติ ชุ่มกฤษ	571	5	4	ต.ปากช่อง อ.จอมบึง จ.ราชบุรี	13.63563	99.72285
11. นายสมรวม ลอยอากาศ	864	2	2	ต.ท่าราบ อ.เมือง จ.ราชบุรี	13.60260	99.80437
12. นายปลื้ม เนียมราช	602	1	-	ต.คลองข่อย อ.โพธาราม จ.ราชบุรี	13.671114	99.824013
13. นายเสาร์ คำเครือ	755	3	3	ต.ท่าผา อ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี	13.86774	99.89695
14. นายมนัส แสงประเสริฐ	249	4	-	ต.โพรงมะเดื่อ อ.เมือง จ.นครปฐม	13.90147	99.92043
15. นายชาญชัย แซ่อึ้ง	429	-	8	ต.ทุ่งขวาง อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม	13.96578	99.96187
รวม		54	51			
รวมทั้งหมด		105				



ภาพที่ 51 พิกัดแปลงเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจัดทำแปลงขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว ในจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี และนครปฐม

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การผลิตขยายต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากท่อนพันธุ์อ้อยที่ผ่านการตรวจว่าปลอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิค nested PCR แล้ว 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK 92-11 ผลจากการเพาะเลี้ยงใบอ่อนขนาด 0.5 ซม. ปลายยอดขนาดสูง 0.2-0.3 ซม. และเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.5-0.7 มม. ในอาหารสูตรทดลอง คือ อาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D 1 มก./ล. และ น้ำมะพร้าว 10% (โดยปริมาตร) พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน แคลลัสขยายขนาดเพิ่มขึ้นและเกาะกันเป็นก้อนมีสีเหลืองอมขาว และเกิดจุดกำเนิดยอดสีเขียวจำนวนมาก ขนาดประมาณ 1.50 ซม. 1 ซม. และ 0.5 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเกิดแคลลัสจากชิ้นส่วนใบอ่อน ยอด หรือ เนื้อเยื่อเจริญของอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ พบว่า ชิ้นส่วนใบอ่อนมีการเกิดแคลลัสบริเวณรอยตัดได้เร็วที่สุด ส่วนปลายยอด และเนื้อเยื่อเจริญ เกิดแคลลัสช้ากว่าใบอ่อน และพบว่า เนื้อเยื่อเจริญ พัฒนาเกิดแคลลัสได้ช้าที่สุดในอาหารสูตรเดียวกันและเวลาที่เท่ากัน (2 เดือน) เมื่อพิจารณาจำนวนชิ้นส่วนที่มาทดลอง พบว่าจำนวนชิ้นส่วนของใบอ่อนสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้มากที่สุด (87.50-91.67%) รองลงมาคือ ปลายยอด (50-58.33%) และเนื้อเยื่อเจริญ (41.67-50%) ตามลำดับ ผลการตรวจตัวอย่างแคลลัสด้วยเทคนิค nested PCR ที่สุ่มจากอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 40 ตัวอย่าง และ LK92-11 จำนวน 35 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในทุกตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้การคัดเลือกกระจุกต้นอ้อยทั้ง 2 พันธุ์ที่ผ่านการตรวจสอบว่าปลอดจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวแล้ว มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีสารเร่งการเจริญเติบโต เพื่อเพิ่มปริมาณกระจุกต้นจำนวนมาก เฉลี่ยพันธุ์ละ 1000 กระจุกต้น เพื่อใช้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการเลี้ยงเพิ่มปริมาณต้นจำนวนมากในอาหารเหลวแบบจุ่มชั่วคราว

ทำการย้ายต้นจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อลงอาหารแข็งที่มีอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ จากนั้นจึงนำต้นไปเพิ่มปริมาณในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวขนาดภาชนะ 700 มิลลิลิตร ในอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการให้อาหาร 12 ครั้งๆ ละ 15 นาที เมื่อครบ 4 สัปดาห์จะตัดถ่ายจนกระทั่งได้ครบตามที่กำหนด ซึ่งนำมาทดลองการใช้ NAA ในการชักนำการออกรากในระบบไบโอรีแอคเตอร์เช่นกัน พบว่า NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำการเกิดรากได้ดี จากนั้นจึงนำอ้อยออกปลูกในเรือนโรงควบคุมอุณหภูมิ โดยนำเลี้ยงในถาดหลุมขนาด 200 หลุมต่อถาดเป็นเวลานาน 2 เดือน ผลิตได้อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 23,000 ต้น และพันธุ์ LK92-11 จำนวน 20,000 ต้น รวมทั้งหมด 43,000 ต้น

ปลูกต้นกล้าอ้อยที่ได้จากระบบไบโอรีแอคเตอร์ในแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน พันธุ์ละ 5 ใช้ต้นกล้าอ้อยประมาณพันธุ์ละ 10,800 ผลการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงพันธุ์หลักพบว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 มีการแตกกอดีกว่าพันธุ์ LK92-11 เมื่ออ้อยอายุ 6 เดือน มีจำนวนหน่อต่อกอ 7.8 และ 5.7 หน่อ ตามลำดับ เมื่ออ้อยอายุ 8 เดือน พันธุ์ขอนแก่น 3 มีจำนวนตาต่อลำ 18 ตา มากกว่าพันธุ์ LK92-11 ซึ่งมีจำนวน 16 ตาต่อลำ เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตต่อไร่พบว่าพันธุ์ LK92-11 มีผลผลิต 22 ตันต่อไร่ มากกว่าพันธุ์ขอนแก่น 3 ซึ่งมีผลผลิต 18.7 ตันต่อไร่

การชำอ้อยอายุ 8 เดือน จากแปลงพันธุ์หลัก และเพาะในถาดเพาะขนาด 21 หลุม เลี้ยงไว้ในโรงเรือนกันแมลง จำนวน 350,000 ต้น พบว่าพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 มีความงอก 92.32 และ 85.42 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจากเพาะเลี้ยงไว้ 1.5 เดือน ได้ต้นที่สมบูรณ์พร้อมส่งมอบเกษตรกร คิดเป็น 89.65 และ 76.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ทางโครงการได้ส่งมอบต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรีที่เข้าร่วมโครงการเมื่อวันที่ 27 มิถุนายน 2560 ซึ่งมีเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการและรับมอบต้นกล้าจำนวน 15 ราย มีพืชปลูกแปลงอยู่ในจังหวัดราชบุรี 10 ราย กาญจนบุรี 3 ราย และนครปฐม 2 ราย รวมพื้นที่ 105 ไร่ แบ่งเป็นพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 52 ไร่ พันธุ์ LK92-11 จำนวน 49 ไร่

บรรณานุกรม

- นพมณี โทปัญญานนท์, ทิพวัลย์ สุกุมลนันท์, จิตราพรรณ พิสิฏ, เศรษฐพงษ์ เลขะวัฒนะ, เนติ วรรณช และ สุธรรม อนุชาติกิจเจริญ. 2549. การวิจัยไม้ดอกไม้ประดับเพื่องานมหกรรมพืชสวนโลก. กรุงเทพฯ: รายงานวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 89 น.
- นิลุบล ทวีกุล, ทักษิณา คັນสยะวิชัยม กาญจนา กิรศักดิ์, ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, นฤทัย วรสถิต และ เพียงเพ็ญ ศรวัต. 2555. การจัดการโรคใบขาวอ้อยด้วยการใช้พันธุ์ปลอดโรค. น. 241-248. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3.
- รกรอง หอมหวล สุภาพร กลิ่นคง และประเสริฐ ฉัตรวิชระวงษ์ . 2542. รายงานการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรมฉบับสมบูรณ์ เรื่องการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยให้มีคุณภาพและปราศจากโรคใบขาวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- รกรอง หอมหวล สุภาพร กลิ่นคง เรวัต เลิศฤทัยโยธิน กมลศรี สระทองพรม และ รัตนา เอการัมย์. 2550. การเพาะเลี้ยงปลายยอดอ้อยปลอดโรคและการศึกษาต้นทุนการผลิตในห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 4 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 6-7 ธันวาคม 2550.
- สุภาพร กลิ่นคง พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทศน์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืชบางชนิดที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 35 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.
- Bekele, B., Abeysinghe, S., Hoat, T. X., Hodgetts, J., Dickinson, M., Bertaccini, A., & Maini, S. 2011. Development of specific secA-based diagnostics for the 16SrXI and 16SrXIV phytoplasmas of the Gramineae. Bulletin of Insectology, 64, S15-S16.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.
- Gundersen, D. E. and I.-M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathol. Mediterr. 35: 114-151.
- .Kollar, A. and E. Seemuller. 1989. Base composition of the DNA of Mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. J. Phytopath. 127: 177-186.
- Lee, I.-M., R.E. Davis and D.E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic Mollicutes. Annu. Rev. Microbiol. 54: 221-225.
- Lee, I.-M., R.W. Hammond, R.E. Davis and D.E. Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. Phytopathology 83: 834-842.
- Maccone, C., H. Neimark, A. Ragozzino, U. Lauer and E. Seemuller. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. Phytopathology 89: 805-810.
- Tomlinson, J.A., N. Boonham and M. Dickinson. 2010. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasma. Plant Pathology 59: 465-471.