



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การจัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาว (ต่อเนื่อง)”

โดย

รองศาสตราจารย์สุภาพร กลิ่นคง และคณะ

เมษายน 2563

สัญญาเลขที่ RDG61T0123

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การจัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาว (ต่อเนื่อง)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

สุภาพร กลิ่นคง	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
รณภพ บรรเจิดเชิดชู	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
คณินันต์ เหมยวรากร	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ษมากร ภูวิธกรณ์	ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

และสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม (สกสว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย วช.-สกสว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	6
บทสรุปผู้บริหาร	7
บทคัดย่อ	8
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	10
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	10
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	10
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	14
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	17
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน	17
2	ผลการเกิดโรคใบขาวในอ้อยต่อและพันธุ์อ้อยจากแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 1	17
3	ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอายุ 6 เดือนจากแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 2	18
4	ผลการวิเคราะห์เนื้อดินในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการรุ่นที่ 2	21

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แปลงพันธุ์ขยายอ้อยปลอดโรคใบขาวอายุ 2-4 เดือน (ก, ค, จ, ช) และอ้อยอายุ 6 เดือน (ข, ง, ฉ, ซ) แปลงพันธุ์LK92-11 ของนางเซ็งฮื่อ อุ่นเพชร (ก-ข) นายบุญส่ง หงส์เวียงจันทร์ (ค-ง) และนายชัยยันต์ ดาววีระกุล (จ-ฉ) และแปลงพันธุ์ขอนแก่น 3 ของนางไพลิน การะเกตุ (ซ-ช)	19
2	gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR ตัวอย่างอ้อยจากแปลงเกษตรกรรุ่นที่ 2	20

การจัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาว (ต่อเนื่อง)
Production of foundation plot of white leaf disease free sugarcane

สุภาพร กลิ่นคง รณภพ บรรเจิดเชิดชู คณิงนิตย์ เหริยญวรากร และ ชมาภร ภูวิธกรณ
Supaporn Klinkong, Ronnapop Bunjoedchoedchu, Kanungnit Reanwarakorn
and Samabhorn Bhuvitarkorn

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้เป็นการดำเนินการเป็นเวลา 6 เดือน ต่อเนื่องจากการวิจัย ปีงบประมาณ 2559 และ 2560 (โครงการ การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว และโครงการ การจัดทำแปลงพันธุ์ขยายอ้อยปลอดโรคใบขาว) ซึ่งทั้ง 2 โครงการได้มอบต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวจำนวน 350,000 และ 250,000 ต้น ให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี และโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุทอง ตามลำดับ งานวิจัยนี้ดำเนินการติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุทอง 15 ราย มีพิกัดแปลงอยู่ในจังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรี ผลจากการสำรวจอาการโรคใบขาวในแปลงอ้อยอายุ 2-4 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาวและจากการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยสุ่มอ้อยอายุ 6 เดือน ผลตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา และผลสำรวจแปลงอ้อยใกล้เคียงกับแปลงเกษตรกร พบอ้อยมีอาการใบขีดเหลืองคล้ายอาการขาดธาตุอาหาร และได้เก็บมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ผลการตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา สภาพพื้นที่บริเวณแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรในอ.อุทอง จ.สุพรรณบุรี ยังไม่พบการระบาดของโรคใบขาว ซึ่งจากการวิเคราะห์เนื้อดินพบว่าเป็นดินร่วน ดินร่วนปนทราย ดินร่วนเหนียว ดินร่วนเหนียวปนทราย และดินเหนียวปนทรายไม่เป็นดินทรายซึ่งเหมาะกับการเพิ่มประชากรแมลง แต่อย่างไรก็ตามก็ควรให้ความรู้เกษตรกรไม่ให้นำพันธุ์อ้อยจากแหล่งระบาดเข้ามาปลูก

การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 1 โรงงานน้ำตาลราชบุรี (ปีงบประมาณ 2559) จากการสอบถามเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 12 ราย ซึ่งการปลูกในปีที่ 1 ไม่เกิดโรคใบขาว มีพิกัดแปลงอยู่ในจังหวัดนครปฐม 2 ราย ราชบุรี 9 ราย และกาญจนบุรี 1 ราย ไม่พบโรคใบขาวในอ้อยต่อ และพันธุ์อ้อยจากแปลงพันธุ์ขยาย

นอกจากนี้โครงการได้จัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาวเพื่อผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ในพื้นที่ 5 ไร่ ภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อส่งมอบให้เกษตรกรภายใต้แผนงานวิจัย “การเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบขาวอ้อย” ต่อไป

จากผลงานวิจัยที่ดำเนินการเป็นเวลา 3 ปี เป็นการใช้เทคโนโลยีที่มีการศึกษามาก่อนแล้ว และนำมาปรับใช้ขยายผลสู่เกษตรกรได้อย่างเป็นรูปธรรม โดยต้นพันธุ์ปลอดโรคใบขาวที่ส่งเสริมให้เกษตรกรในโครงการนี้เป็นพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกทั่วไป อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าโครงการนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการต่อยอดงานวิจัยโดยดำเนินการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวในอ้อยพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อเป็นทางเลือกของเกษตรกรในพื้นที่ที่มีการระบาดรุนแรง

บทคัดย่อ

การเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยชำข้อที่ปลูกในแปลงพันธุ์หลัก ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน พบว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 ในอ้อยอายุ 4 เดือน มีจำนวนหน่อตอก 7.6 และ 6.9 หน่อความสูง 133.8 และ 128.4 เซนติเมตร ตามลำดับ ตรวจแปลงไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาว และตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอายุ 6 เดือน ด้วยเทคนิค nested PCR การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุ้มทอง 15 ราย ในจังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรี ผลจากการสำรวจอาการโรคใบขาวในแปลงอ้อยอายุ 2-4 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาวและจากการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยสุ่มอ้อยอายุ 6 เดือน แปลงละ 10 ตัวอย่าง ผลตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา และพบว่าไม่เกิดโรคใบขาวในอ้อยต่อแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี ในจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี และนครปฐม

คำสำคัญ: อ้อย, โรคใบขาว, เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ, เทคนิค nested PCR

ABSTRACT

Data collection of transplanted sugarcane seedlings, 4 months after planting, in foundation field at Kasetsart University, Kamphaengsaen, showed that numbers of buds per stalk and stalk length of Khonken 3 and LK92-11 were 7.6 and 6.9 buds per stalk, 133.8 and 128.4 cm., respectively. Sugarcane whiteleaf disease was not founded in all seedlings. Six months after planting, detection of sugarcane white leaf phytoplasma by nested PCR showed negative result.

The certified fields of 15 of U-Thong Sugar Industry Co, Ltd 's farmers, located in the Suphan Buri and Kanchanaburi, were monitored for the reinfection of sugarcane whiteleaf phytoplasma of the transplanting seedlings. For the period of 2-4 months after planting, sugarcane whiteleaf disease was not founded in the certified fields. Detection of sugarcane white leaf phytoplasma from 10 samples per rai of six month' old sugacane showed negative result. Sugarcane whiteleaf disease was not founded in ratoon crops of the certified fields of 15 Ratburi Sugar Co, Ltd 's farmers, located in the Ratchaburi, Kanchanaburi and Nakhon Pathom.

Keywords: sugarcane, white leaf disease, tissue culture, nested PCR technique

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

โรคใบขาวอ้อยมีการระบาดอย่างต่อเนื่องในพื้นที่ปลูกอ้อย นับเป็นโรคที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งของการผลิตอ้อยในประเทศไทย ในปัจจุบันมีรายงานการระบาดปีละไม่น้อยกว่า 200,000 ไร่ ความเสียหายคิดเป็นมูลค่าไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านบาท สาเหตุโรคเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งมีการแพร่กระจายของเชื้อโดยการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรคใบขาว และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ จากการขยายกำลังการผลิตอ้อยโดยการเพิ่มพื้นที่ปลูกทำให้เกิดการขาดแคลนท่อนพันธุ์ จึงทำให้เกิดภาวะการขนย้ายท่อนพันธุ์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นท่อนพันธุ์ที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาแฝงอยู่ข้ามไปยังเขตอื่นและกระจายไปยังทุกแหล่งปลูก ส่งผลให้การแพร่ระบาดของโรคใบขาวเป็นไปอย่างรวดเร็ว และชาวไร่อ้อยส่วนใหญ่มักเก็บอ้อยที่ปลูกส่งโรงงานไว้ใช้ทำพันธุ์ต่อ ทำให้พื้นที่ปลูกอ้อยมีการระบาดเพิ่มขึ้นและขยายวงกว้างขึ้นทุกปี เป็นการสะสมโรคใบขาวเรื้อรังก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงในระยะยาว การใช้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและผ่านกระบวนการอนุบาลต้นกล้าจนถึงการผลิตต้นอ้อยเพื่อใช้เป็นท่อนพันธุ์ปลอดโรคใบขาวในแปลง การตรวจแปลง และการตรวจรับรองแปลงพันธุ์ปลอดโรคใบขาว ร่วมกับการควบคุมแมลงพาหะเพื่อลดการระบาดของโรคใบขาวในแปลง เป็นวิธีการในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยที่ได้ผลแบบยั่งยืนในระยะยาวและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป

โครงการวิจัยนี้เป็นงานที่ขยายผลต่อเนื่องจากโครงการปีงบประมาณ 2559 เรื่อง “การขยายผลเทคโนโลยีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว” และปีงบประมาณ 2560 เรื่อง “การจัดทำแปลงพันธุ์ขยายอ้อยปลอดโรคใบขาว” ซึ่งผลิตได้ต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวจำนวน 600,000 ต้น จากการนำเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การขยายพันธุ์พืชในเชิงอุตสาหกรรมด้วยระบบไฮโดรแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว การอนุบาลต้นกล้าในระบบโรงเรือนกันแมลง และการตรวจเชื้อด้วยเทคนิคที่มีความไวสูง โดยมอบให้เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี และโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุททองที่ได้รับการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวนำไปปลูกเพื่อจัดทำแปลงพันธุ์ขยายจำนวน 200 ไร่

โครงการนี้จะดำเนินการชำอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 จากแปลงพันธุ์หลักและตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อยืนยันการปลอดเชื้อ และนำออกปลูกในแปลงพันธุ์หลัก รวมทั้งติดตามผลการปลูกอ้อยปลอดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่รับมอบต้นพันธุ์ไปแล้วทั้งสองรุ่น จำนวน 200 ไร่

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 จัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาวพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11

1.2.2 ติดตามเก็บข้อมูลในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่รับมอบต้นพันธุ์ จำนวน 200 ไร่

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

- 1.3.1 เตรียมแปลงพันธุ์หลักพื้นที่ 5 ไร่ ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
- 1.3.2 ขำซื้ออ้อยจากแปลงพันธุ์หลักแปลงเดิม และปลูกในโรงเรือนเพาะชำเพื่อใช้ปลูกในแปลงพันธุ์หลัก 5 ไร่
- 1.3.3 ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต้นกล้าอ้อยชำซื้อด้วยเทคนิค nested PCR
- 1.3.4 ปลูกอ้อยชำซื้ออายุ 1.5 เดือน บันทึกเปอร์เซ็นต์การรอดตาย การเจริญเติบโต และสุ่มตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR
- 1.3.5 การติดตามเก็บข้อมูลในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่รับมอบต้นพันธุ์
 - เกษตรกรรุ่นที่ 1 เครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี ดำเนินการเก็บข้อมูลการเกิดโรคใบขาวโดยการสอบถามเกษตรกร
 - เกษตรกรรุ่นที่ 2 เครือข่ายโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุ้มทอง ดำเนินการเก็บข้อมูลการเกิดโรคใบขาวโดยการสำรวจอาการโรคในช่วง 2- 4 เดือน และสุ่มตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอายุประมาณ 6 เดือน

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (outputs)
6 เดือนที่ 1	1. เตรียมแปลงพันธุ์หลักพื้นที่ 5 ไร่	แปลงในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 5 ไร่
	2. ขำซื้ออ้อยจากแปลงพันธุ์หลักแปลงเดิม	ต้นกล้าอ้อยชำซื้อพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 จำนวนพันธุ์ละ 5,000 ต้น
	3. ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาเหตุโรคใบขาวอ้อยในต้นกล้าอ้อยชำซื้อ	ได้ต้นกล้าอ้อยชำซื้อปลอดเชื้อไฟโตพลาสมา
	4. ปลูกต้นกล้าอ้อยปลอดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์หลัก	ได้แปลงพันธุ์หลักผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาวของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11
	5. ติดตามเก็บข้อมูลการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่รับมอบต้นพันธุ์	ข้อมูลการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุ้มทอง และโรงงานน้ำตาลราชบุรี

บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่มีผนังเซลล์รูปร่างไม่แน่นอน มีขนาดเล็กประมาณ 200-800 นาโนเมตร จีโนมมีขนาดเล็กตั้งแต่ 530-1350 กิโลเบส (Marccone *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 ส่วนในพืช อาจก่อให้เกิดกลุ่มอาการที่ซับซ้อนด้วยลักษณะอาการที่เฉพาะ เช่น ดอกเขียว แตกกพุ่มฝอย ดอกเป็นหมัน การแตกพุ่มของยอด การยืดยาวของปล้องที่ผิดปกติ อาการเหลือง แคระแกร็น รวมทั้งพบอาการใบขาวในอ้อยและหญ้า (Lee *et al.*, 2000) โรคใบขาวอ้อย มีการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโดยจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นหรือตอที่เป็นโรค และยังสามารถถ่ายทอดเชื้อได้โดยมีแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นเป็นแมลงพาหะ 2 ชนิด ได้แก่เพลี้ยจักจั่นปีกลาย (*Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura) และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว ชนิด *Yamatotettix flavovittatus* Matsumura) จากการศึกษาพบว่าเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* มีการวางไข่ในดิน สภาพดินที่เหมาะสมในการวางไข่คือดินที่มีสภาพความเป็นทราย (sandy soil) (Yang and Pan, 1969) แนวทางการควบคุมโรคใบขาวอ้อยที่แนะนำกันโดยทั่วไป ได้แก่ การใช้พันธุ์ท่อนพันธุ์สะอาดจากแหล่งที่ไม่มีการระบาด การใช้อ้อยปลอดเชื้อที่ได้จากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การควบคุมแมลงพาหะ การเปลี่ยนเวลาปลูกเพื่อเลี่ยงการติดเชื้อจากแมลงพาหะ การตัดวงจรการระบาดของโรคโดยปลูกพืชหมุนเวียนที่ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรคและแมลงพาหะ การทำลายกออ้อยเป็นโรค เป็นต้น วิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ให้ผลแบบยั่งยืน คือการใช้พันธุ์ต้านทานโรค อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์อ้อยให้ต้านทานโรคใบขาว แต่ยังไม่มียางานถึงความสำเร็จ การป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยให้ได้ผลเป็นที่ยอมรับในขณะนี้ 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 และต้องใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณแคลลัสและการพัฒนาเป็นต้นประมาณ 2 – 3 เดือน ซึ่งมีการพัฒนาเทคนิคโดยนำต้นที่ทดสอบแล้วว่าปลอดโรคจากงานวิจัยมาเป็นต้นแบบสำหรับการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของ ขั้ว ใบอ่อน ฯลฯ จะช่วยลดระยะเวลาในการผลิตจากการใช้เนื้อเยื่อเจริญโดยตรง นิรุบล และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาประเมินความเป็นไปได้ในการจัดการโรคใบขาวโดยใช้พันธุ์อ้อยปลอดโรค โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยอดอ่อนของอ้อย และได้ผ่านการตรวจเชื้อสาเหตุโรค ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (nested PCR) ที่ไม่พบเชื้อโรค แล้วนำต้นกล้าย้ายปลูกและอนุบาลในโรงเรือนกันแมลง เมื่อนำไปปลูก

ในสภาพแปลงปลูกในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในช่วงปี 2549-2554 พบว่า การปลูกพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว ห่างจากแปลงอ้อยอื่นๆ 1 กิโลเมตร หรือมากกว่า สามารถไว้ต้นต่อได้ 3-4 ตอ โดยพบต้นเป็นโรคใบขาวน้อยกว่า 1 %

นอกจากนี้ยังงานวิจัยที่ประยุกต์วิธีการเลี้ยงโดยใช้อาหารแข็งร่วมกับอาหารเหลว คือวิธีการเลี้ยงแบบจุ่มชั่วคราว (temporary Immersion) นพมณี และคณะ (2549) ได้นำหลักการทำงานของระบบไบโอรีแอคเตอร์แบบใช้อากาศอัตโนมัติเพาะเลี้ยงต้นพืช โดยใช้ขวดแก้วขนาด 700 มิลลิลิตร เป็นภาชนะบรรจุอาหารเหลวและขึ้นส่วนพืช และใช้นาฬิกาจับเวลาแบบดิจิทัลเพื่อควบคุมการทำงานของวาล์วไฟฟ้าที่จ่ายและระบายอากาศในระบบไบโอรีแอคเตอร์ และนำระบบที่พัฒนาขึ้นไปทดสอบใช้งานเพื่อขยายพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น ปทุมมา หงส์เหิน กล้วย สับปะรด กล้วยไม้ ในปีพ.ศ. 2552 และ 2554 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้สนับสนุนทุนวิจัยแผนงานวิจัยเรื่องระบบการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวขนาดอุตสาหกรรม เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวมาผลิตต้นอ้อยให้ได้ในปริมาณมาก ตอบสนองต่อความต้องการต้นอ้อยที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า 1,000,000 ต้นต่อปี ในการวิจัยนี้มีการนำภาชนะพลาสติกขนาดความจุ 20 ลิตร มาใช้เป็นภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงต้นอ้อยแทนที่จะใช้ขวดแก้วขนาดเล็ก 700 มิลลิลิตร และพัฒนาระบบคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการทำงานของวาล์วไฟฟ้าแทนนาฬิกาจับเวลาแบบดิจิทัล ซึ่งระบบคอมพิวเตอร์สามารถควบคุมการทำงานของไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว ได้อิสระพร้อมกัน จำนวน 8 ชุด ต้นแบบของระบบการผลิตต้นอ้อยในปริมาณมากด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว จากการปฏิบัติงานพบว่า การขยายพันธุ์ต้นอ้อยในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวจะต้องมีการเลือกใช้ภาชนะที่มีขนาดและจำนวนแตกต่างกันให้เหมาะสมกับกระบวนการผลิตในแต่ละช่วง

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณน้อยในต้นพืช ในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคนิคด้านชีวโมเลกุลให้สามารถตรวจเชื้อได้รวดเร็ว แม่นยำ เชื่อถือได้ ได้แก่ เทคนิค PCR หรือ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมา ใช้ตรวจยีน 16S rRNA, 16S-23S ITS และ 23S rRNA ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาทุกชนิด (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 มีประสิทธิภาพในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีกว่าเทคนิค PCR ถึง 10 เท่าจึงเป็นวิธีที่เป็นทางเลือกใหม่ในการตรวจเชื้อได้อย่างจำเพาะ รวดเร็วและตรวจเชื้อที่มีปริมาณน้อยๆได้ และ ต่อมาได้พัฒนาการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในพืชตระกูลหญ้ารวมทั้งโรคใบขาวในอ้อยได้สำเร็จด้วยการตรวจยีน *Sec A* (Bekele *et al.*, 2011) ในปีพ.ศ. 2557 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติได้สนับสนุนทุนวิจัยเรื่องนวัตกรรม การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์อ้อย ในการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค LAMP ด้วยการตรวจยีน 16S rRNA พบว่าเทคนิคที่พัฒนามีความไวในการตรวจเทียบเท่าเทคนิค nested PCR

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การจัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาว

1.1 การชำซ่ออ้อยในโรงเรือนปลูกพืชกันแมลงก่อนปลูกลงแปลง

นำท่อนพันธุ์อ้อยอายุ 7 เดือน ที่ได้จากแปลงพันธุ์หลักมาตัดท่อนละ 1 ตา เพาะในถาดเพาะขนาด 21 หลุม โดยใช้วัสดุเพาะ พีทมอส : ขุยมะพร้าว : ชี้เถ้าแกลบ : แกลบดิบ อัตราส่วน 1:1:1:1 ให้ได้จำนวนต้นกล้า พันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 พันธุ์ละ 5,000 ต้น

สุ่มต้นกล้าจากการชำซ่ออายุ 1 เดือน นำมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR จำนวน 100 ตัวอย่าง (1% จากต้นกล้า 10,000 ต้น)

1.2 การเตรียมแปลงพันธุ์หลัก

ใช้พื้นที่แปลงพันธุ์หลักแปลงเดิมภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จำนวน 5 ไร่ ปรับพื้นที่ แบ่งเป็น 2 แปลงๆ ละ 2.5 ไร่ ไถและยกร่องให้มีระยะห่าง 1.5 เมตร

1.3 การปลูกและดูแลอ้อยในแปลง

1.3.1 เตรียมต้นกล้าที่จะย้ายปลูกอายุ 1.5 เดือน ตัดใบให้ต้นกล้าสูงประมาณ 30 เซนติเมตร ฉีดพ่นสารกำจัดแมลงชนิดดูดซึมก่อนปลูก ปลูกต้นกล้าในร่องให้มีระยะห่างระหว่างต้น 50 เซนติเมตร ปลูกแล้วให้น้ำตามร่องทันที ปลูกซ่อมต้นที่ตายภายใน 1 เดือน หลังปลูก

1.3.2 การดูแลอ้อยในแปลง

- ฉีดพ่นสารกำจัดวัชพืช หลังปลูก 2 เดือน และ ไถกำจัดวัชพืช หลังปลูก 4 เดือน
- ฉีดพ่นสารกำจัดแมลง หลังปลูก 2 เดือน
- ให้อุ๋ยสูตร 16-16-16 ไร่ละ 50 กิโลกรัม จำนวน 2 ครั้ง หลังปลูก 3 และ 5 เดือน
- สำรวจโรคใบขาวในแปลงหลังปลูก 3 และ 6 เดือน

1.3.3 สุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยสุ่มพันธุ์ละ 25 ตัวอย่าง จากหัวแปลง กลางแปลง และท้ายแปลง (สุ่มไร่ละ 10 ตัวอย่าง)

2. ติดตามเก็บข้อมูลการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่รับมอบต้นพันธุ์

2.1 การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 1 เครือข่ายโรงงานน้ำตาลราชบุรี

เก็บข้อมูลการเกิดโรคใบขาวโดยการสอบถามเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 12 ราย ซึ่งการปลูกในปีที่ 1 ไม่เกิดโรคใบขาว มีพื้เกิดแปลงอยู่ในจังหวัดนครปฐม 2 ราย ราชบุรี 9 ราย และกาญจนบุรี 1 ราย

2.2 การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 2 เครือข่ายโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุทอง

สำรวจอาการโรคใบขาวในแปลงอ้อยอายุ 2-4 เดือน และสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยสุ่มอ้อยอายุ 6 เดือน แปลงละ 10 ตัวอย่าง จากหัวแปลง กลางแปลง และท้ายแปลง

ขั้นตอนการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค nested PCR

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) วิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างอ้อยและอ้อยปกติมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค 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 ไพรมเมอร์ R16mF2/R16mR1 (10 pmol/μl) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร Dream Taq DNA polymerase (0.1 unit/μl) 0.25 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อ 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 ที่

ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 ด้วยปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการใช้ไพรเมอร์คู่แรก นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3. การวิเคราะห์เนื้อดินในแปลงพันธุ์ขยาย

เก็บตัวอย่างดินในแปลงของเกษตรกร 12 ราย โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างดินตามวิธีของภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน สุ่มเก็บตัวอย่างดินทั่วทั้งแปลงประมาณ 15 จุดต่อพื้นที่ 25 ไร่ เก็บลึกประมาณ 15 เซนติเมตร แล้วคลุกเคล้าตัวอย่างดินในถังพลาสติกให้เข้ากันแล้วแบ่งกองดินส่งวิเคราะห์ประมาณ 1 กิโลกรัม จากนั้นนำส่งวิเคราะห์เนื้อดินเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการแพร่ระบาดของโรคใบขาวโดยแมลงพาหะ

บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การจัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาว

ผลการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยชำข้อที่ปลูกในแปลงพันธุ์หลักพบว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 มีเปอร์เซ็นต์รอดตาย 98 และ 97 ตามลำดับ การเก็บข้อมูลอ้อยอายุ 4 เดือน มีจำนวนหน่อต่อกอ 7.6 และ 6.9 หน่อความสูง 133.8 และ 128.4 เซนติเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการตรวจแปลงไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาว ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอายุ 6 เดือน ด้วยเทคนิค nested PCR จากการสุ่มตัวอย่างอ้อยไร่ละ 10 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา

ตารางที่ 1 ข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยในแปลงพันธุ์หลักในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ข้อมูลการเจริญเติบโต	พันธุ์ขอนแก่น 3	พันธุ์ LK92-11
เปอร์เซ็นต์รอดตาย	98	97
จำนวนหน่อ/กอ (4 เดือน)	7.6	6.9
ความสูง (ซม.) (4 เดือน)	133.8	128.4

2. ติดตามเก็บข้อมูลการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่รับมอบต้นพันธุ์

2.1 การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 1 โรงงานน้ำตาลราชบุรี

จากการสอบถามเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 12 ราย ซึ่งการปลูกในปีที่ 1 ไม่เกิดโรคใบขาว มีฟักตแปลงอยู่ในจังหวัดนครปฐม 2 ราย ราชบุรี 9 ราย และกาญจนบุรี 1 ราย ไม่พบโรคใบขาวในอ้อยต่อ และพันธุ์อ้อยจากแปลงพันธุ์ขยาย (ตารางที่ 2) นอกจากนี้มีเกษตรกรบางรายได้แก่ นายสรารุณี เนียมเตียง ต.ธรรมเสน อ.โพธาราม จ.ราชบุรี ได้ขออนุญาตอ้อยปลอดโรคใบขาวที่ผลิตในปีนี้นำไปปลูกเพิ่มเติมอีก 1.5 ไร่

ตารางที่ 2 ผลการเกิดโรคใบขาวในอ้อยต่อและพันธุ์อ้อยจากแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 1

ชื่อ - สกุล	จังหวัดที่ตั้งแปลง	% การเกิดโรคใบขาวในแปลงอ้อยต่อ	% การเกิดโรคใบขาวในพันธุ์อ้อยจากแปลงพันธุ์ขยาย
1. น.ส. ลัดดา เข้มทอง	กาญจนบุรี	ประมาณ 10 %	รื้อแปลง
2. น.ส. มยุรี เข้มทอง	กาญจนบุรี	ประมาณ 20 %	รื้อแปลง
3. นายสนาน นิยม	กาญจนบุรี	0	0
4. นายชมพู กันนะ	ราชบุรี	0	0
5. นายพิชัย เนียมทอง	ราชบุรี	0	0
6. นายภานิช ตั้งกิตติกุล	ราชบุรี	> 90 %	รื้อแปลง
7. นายเสาร์ คำเครือ	ราชบุรี	0	0
8. นายสราวุธ เนียมเตี้ยง	ราชบุรี	0	0
9. นายวน นุชพันธ์	ราชบุรี	0	0
10. นายปลื้ม เนียมราช	ราชบุรี	0	0
11. นายสมรวม ลอยอากาศ	ราชบุรี	0	0
12. นายชูเกียรติ ชุ่มกฤษ	ราชบุรี	0	0
13. นายพรพจน์ พันธุ์ไทย	ราชบุรี	0	0
14. นายมนัส แสงประเสริฐ	นครปฐม	0	0
15. นายชาญชัย แซ่อึ้ง	นครปฐม	0	0

2.2 การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 2 โรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุทอง

จากการสำรวจอาการโรคใบขาวในแปลงอ้อยอายุ 2-4 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาว (ภาพที่ 1) และจากการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยสุ่มอ้อยอายุ 6 เดือน แปลงละ 10 ตัวอย่าง จากหัวแปลง กลางแปลง และท้ายแปลง ผลตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา (ตารางที่ 3 และภาพที่ 2) และผลสำรวจแปลงอ้อยใกล้เคียงกับแปลงของนายบุญส่ง นายเชิงฮือ และนายปิยะ พบอ้อยมีอาการใบซีดเหลือง คล้ายอาการขาดธาตุอาหาร และได้เก็บมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ผลการตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา แต่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าใบขาวจากแปลงอ้อยของนายชัยยันต์ (ภาพที่ 2) ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrXIV เป็นเชื้อคนละกลุ่มกับอ้อยใบขาวซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrXI

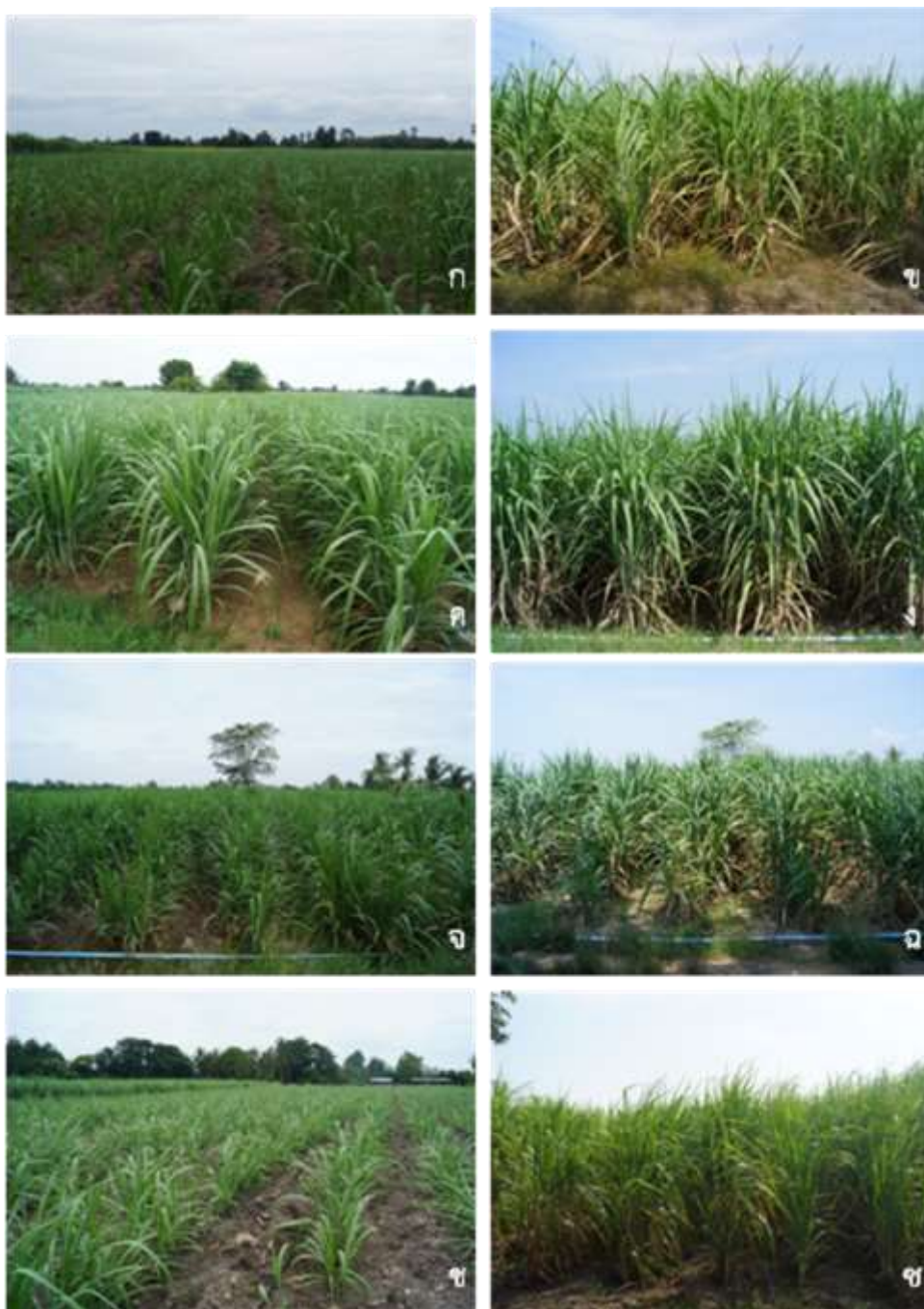
ตารางที่ 3 ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอายุ 6 เดือนจากแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 2

ชื่อ-สกุล	ที่ตั้งแปลง	พันธุ์อ้อย/ไร่		ผลตรวจเชื้อในอ้อยอายุ 6 เดือน	
		KK	LK	KK	LK
1. นายอรุณ อยู่ประเสริฐ	ต.เลาขวัญ อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี	2	2	*	*
2. นายบุญมี สุริยพล	ต.พลับพลาไชย อ. อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	3	-	N	-
3. นายบุญส่ง หงษ์เวียงจันทร์	ต.พลับพลาไชย อ. อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	2	4	N	N
4. นางเดือนเพ็ญ ตั้งแสงสุวรรณ	ต.พลับพลาไชย อ. อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	4	2	N	N
5. นางสาววิภาวรรณ ไทยล้วน	ต.พลับพลาไชย อ. อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	1	-	*	*
6. นายทองมี หงษ์ทองมอญ	ต.ดอนคา อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	1	3	N	N
7. นางทองสุข โพธิ์หอม	ต.ดอนเจดีย์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	8.5	-	N	N
8. นาง ไพลิน การะเกตุ	ต.ดอนเจดีย์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	2	3	N	N
9. นางแข่งฮือ อุ่นเพชร	ต.บ้านโข้ง อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	-	7	-	N
10. นายโลม ช้างเขียว	ต.จรเข้สามพัน อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	1	1	N	N
11. นางพัชริน จุงใจ	ต.จรเข้สามพัน อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	3	-	N	-
12. นายปิยะ เป้ามงคล	ต.ศรีสำราญ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	6	4	N	N
13. นายชัยยันต์ ดาววีระกุล	ต.จรเข้สามพัน อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	-	6	-	N
14. นายสาธิต ลีอารีย์กุล	ต.เลาขวัญ อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี	1	13	**	**
15. นายทวน ทองคำ	ต.จรเข้สามพัน อ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี	-	5	*	*

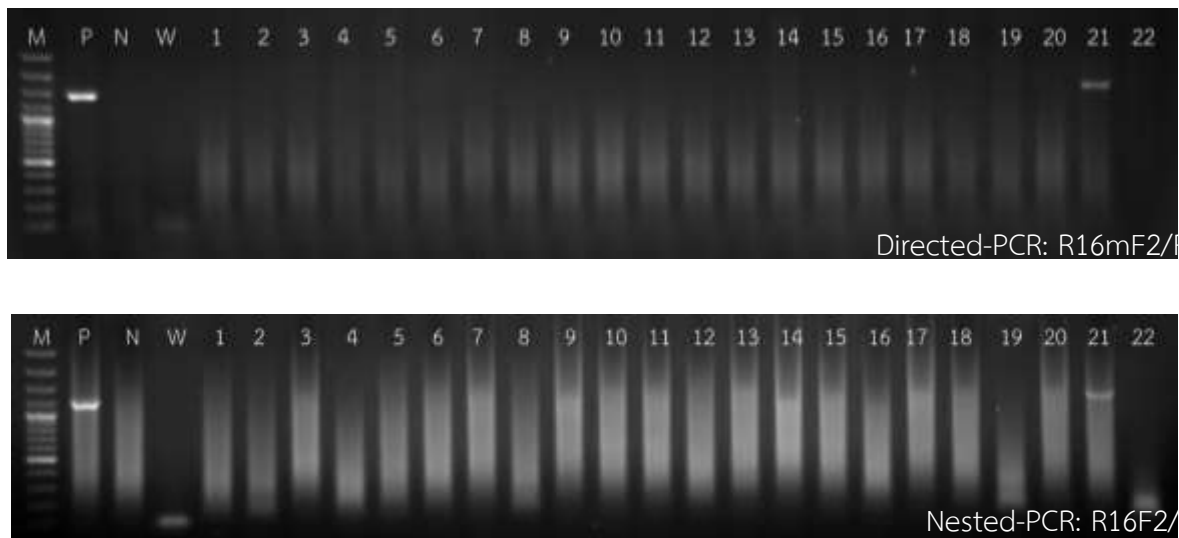
หมายเหตุ N ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา

* ไม่เก็บข้อมูลเนื่องจากต้นกล้าอ้อยตายจากการขาดน้ำในช่วงแรกของการปลูก

** ไม่เก็บตัวอย่างมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาเนื่องจากปลูกล่าช้า



ภาพที่ 1 แปลงพันธุ์ขยายอ้อยปลอดโรคใบขาวอายุ 2-4 เดือน (ก, ค, จ, ช) และอ้อยอายุ 6 เดือน (ข, ง, ฉ, ซ)
 แปลงพันธุ์LK92-11 ของนางเชิงฮื่อ อุ่นเพชร (ก-ข) นายบุญส่ง หงส์เวียงจันทร์ (ค-ง) และนายชัยยันต์
 ดาววีระกุล (จ-ฉ) และแปลงพันธุ์ขอนแก่น 3 ของนางไพลิน การะเกตุ (ช-ซ)



ภาพที่ 2 gel electrophoresis แสดงผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 bp จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค nested PCR ตัวอย่างอ้อยจากแปลงเกษตรกรรุ่นที่ 2

แถบ M	ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)
แถบ P	อ้อยเป็นโรคใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา
แถบ N	อ้อยปกติ
แถบ W	น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ 1	อ้อยจากแปลงนายบุญมี (พันธุ์ขอนแก่น 3)
แถบ 2-3	อ้อยจากแปลงนายบุญส่ง (พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11)
แถบ 4,14,19,22	อ้อยแสดงอาการใบซีดจากแปลงใกล้เคียงของนายบุญส่ง นางเซ็งฮือ นายปิยะ และนายสาธิต
แถบ 5-6	อ้อยจากแปลงนางเดือนเพ็ญ (พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11)
แถบ 7-8	อ้อยจากแปลงนายทองมี (พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11)
แถบ 9	อ้อยจากแปลงนางทองสุข (พันธุ์ขอนแก่น 3)
แถบ 10-11	อ้อยจากแปลงนางไพลิน (พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11)
แถบ 12-13	อ้อยจากแปลงนางเซ็งฮือ (พันธุ์ LK92-11 แปลงที่ 1 และ 2)
แถบ 15-16	อ้อยจากแปลงนายโลม (พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11)
แถบ 17-18	อ้อยจากแปลงนายปิยะ (พันธุ์ขอนแก่น 3 และพันธุ์ LK92-11)
แถบ 20	อ้อยจากแปลงนายชัยยันต์ (พันธุ์ LK92-11)
แถบ 21	หญ้าใบขาวข้างแปลงนายชัยยันต์

3. การวิเคราะห์เนื้อดินในแปลงพันธุ์ขยาย

ผลการวิเคราะห์เนื้อดินเพื่อใช้เป็นข้อมูลประกอบการแพร่ระบาดของโรคใบขาวโดยแมลงพาหะ โดยส่งวิเคราะห์ที่ภาคปฐพีวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน พบว่าแต่ละแปลงมีเนื้อดินเป็นดินร่วน ดินร่วนปนทราย ดินร่วนเหนียว ดินร่วนเหนียวปนทราย และดินเหนียวปนทราย (ตารางที่ 4) เป็นสภาพดินที่ไม่เหมาะกับการวางไข่แมลงพาหะ ซึ่งสภาพดินทรายที่มีระดับความชื้นต่ำเป็นสภาพเหมาะสมที่สุดสำหรับการวางไข่ของแมลงพาหะ แปลงขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวในเขตนี้จึงมีโอกาสดูดโรคใบขาวน้อยกว่าเขตปลูกอ้อยที่เป็นสภาพดินทราย

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์เนื้อดินในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการรุ่นที่ 2

ชื่อ-สกุล	จังหวัดที่ตั้งแปลง	ค่าวิเคราะห์			เนื้อดิน (Texture)
		Sand; %	Silt; %	Clay; %	
1. นายอรุณ อยู่ประเสริฐ	ต.เลาขวัญ อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี	73.25	8.64	18.11	ดินร่วนปนทราย (Sandy Loam)
2. นายบุญมี สุริยพล	ต.พลับพลาไชย อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	25.17	36.74	38.09	ดินร่วนเหนียว (Clay Loam)
3. นายบุญส่ง หงษ์เวียงจันทร์	ต.พลับพลาไชย อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	57.63	20.71	21.66	ดินร่วนเหนียวปนทราย (Sandy Clay Loam)
4. นางเดือนเพ็ญ ตั้งแสงสุวรรณ	ต.พลับพลาไชย อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	51.13	20.50	28.37	ดินร่วนเหนียวปนทราย (Sandy Clay Loam)
5. นางสาววิภาวรรณ ไทยล้วน	ต.พลับพลาไชย อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	*	*	*	*
6. นายทองมี หงษ์ทองมอญ	ต.ดอนคา อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	43.94	26.20	29.87	ดินร่วนเหนียว (Clay Loam)
7. นางทองสุข โพธิ์หอม	ต.ดอนเจดีย์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	63.71	17.55	18.74	ดินร่วนปนทราย (Sandy Loam)
8. นาง ไพลิน การะเกตุ	ต.ดอนเจดีย์ อ.ดอนเจดีย์ จ.สุพรรณบุรี	61.24	17.07	21.68	ดินร่วนเหนียวปนทราย (Sandy Clay Loam)
9. นางเซ่งฮือ อุ่นเพชร	ต.บ้านไผ่ อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	70.50	13.65	15.85	ดินร่วนปนทราย (Sandy Loam)
10. นายโลม ช้างเขียว	ต.จรเข้มสามพัน อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	45.93	19.06	35.01	ดินเหนียวปนทราย (Sandy Clay)
11. นางพัชริน จุงใจ	ต.จรเข้มสามพัน อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	*	*	*	*
12. นายปิยะ เป้ามงคล	ต.ศรีสำราญ อ.สองพี่น้อง จ.สุพรรณบุรี	41.59	19.01	39.39	ดินร่วนเหนียว (Clay Loam)
13. นายชัยยันต์ ดาววีระกุล	ต.จรเข้มสามพัน อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	62.78	12.87	24.35	ดินร่วนเหนียวปนทราย (Sandy Clay Loam)
14. นายสาธิต ลืออารีย์กุล	ต.เลาขวัญ อ.เลาขวัญ จ.กาญจนบุรี	45.76	15.61	38.63	ดินเหนียวปนทราย (Sandy Clay)
15. นายทวน ทองคำ	ต.จรเข้มสามพัน อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี	*	*	*	*

หมายเหตุ * ไม่เก็บข้อมูลเนื่องจากต้นกล้าอ้อยตายจากการขาดน้ำในช่วงแรกของการปลูก

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการดำเนินการเป็นเวลา 6 เดือน ต่อเนื่องจากการวิจัยในปีที่ 2 (ปีงบประมาณ 2560) ซึ่งได้มอบต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวจำนวน 250,000 ต้น ให้แก่เกษตรกรเครือข่ายโรงงานน้ำตาลอุตสาหกรรมอุ้มทอง 15 ราย มีพื้เกิดแปลงอยู่ในจังหวัดสุพรรณบุรี และกาญจนบุรี โดยดำเนินการติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรดังกล่าว ผลจากการสำรวจอาการโรคใบขาวในแปลงอ้อยอายุ 2-4 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาวและจากการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยสุ่มอ้อยอายุ 6 เดือน แปลงละ 10 ตัวอย่าง ผลตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา และผลสำรวจแปลงอ้อยใกล้เคียงกับแปลงของนายบุญส่ง นายเชิงฮือ และนายปิยะ พบอ้อยมีอาการใบขีดเหลืองคล้ายอาการขาดธาตุอาหาร และได้เก็บมาตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ผลการตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา แต่ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าใบขาวจากแปลงอ้อยของนายชัยยันต์ ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrXIV เป็นเชื้อคนละกลุ่มกับอ้อยใบขาวซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrXI สภาพพื้นที่บริเวณแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรในอ.อุ้มทอง จ.สุพรรณบุรี ยังไม่พบการระบาดของโรคใบขาว ซึ่งจากการวิเคราะห์เนื้อดินพบว่าดินเป็นดินร่วน ดินร่วนปนทราย ดินร่วนเหนียว ดินร่วนเหนียวปนทราย และดินเหนียวปนทรายไม่เป็นดินทรายซึ่งเหมาะกับการเพิ่มประชากรแมลง แต่อย่างไรก็ตามก็ควรให้ความรู้เกษตรกรไม่ให้นำพันธุ์อ้อยจากแหล่งระบาดเข้ามาปลูก

การติดตามการเกิดโรคใบขาวในแปลงพันธุ์ขยายของเกษตรกรรุ่นที่ 1 โรงงานน้ำตาลราชบุรี (ปีงบประมาณ 2559) จากการสอบถามเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการจำนวน 12 ราย ซึ่งการปลูกในปีที่ 1 ไม่เกิดโรคใบขาว มีพื้เกิดแปลงอยู่ในจังหวัดนครปฐม 2 ราย ราชบุรี 9 ราย และกาญจนบุรี 1 ราย ไม่พบโรคใบขาวในอ้อยต่อ และพันธุ์อ้อยจากแปลงพันธุ์ขยาย

นอกจากนี้โครงการได้จัดทำแปลงพันธุ์หลักอ้อยปลอดโรคใบขาวในพื้นที่ 5 ไร่ เพื่อผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 เพื่อส่งมอบให้เกษตรกรภายใต้แผนงานวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบขาวอ้อย ผลการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของอ้อยข้าข้อที่ปลูกในแปลงพันธุ์หลักพบว่าอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 และ LK92-11 มีเปอร์เซ็นต์รอดตาย 98 และ 97 ตามลำดับ การเก็บข้อมูลอ้อยอายุ 4 เดือน มีจำนวนหน่อต่อกอ 7.6 และ 6.9 หน่อความสูง 133.8 และ 128.4 เซนติเมตร ตามลำดับ จากการตรวจแปลงไม่พบอ้อยมีอาการโรคใบขาว ผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยอายุ 6 เดือน ด้วยเทคนิค nested PCR จากการสุ่มตัวอย่างอ้อยไร่ละ 10 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมา

บรรณานุกรม

- นพมณี โทปัญญานนท์, ทิพวัลย์ สุกุมลนันท์, จิตราพรรณ พิลัง, เศรษฐพงศ์ เลขาวัฒนนะ, เนติ วรรณช และ สุธรรม อนุชาติกิจเจริญ. 2549. การวิจัยไม้ดอกไม้ประดับเพื่องานมหรหรมพืชสวนโลก. กรุงเทพฯ: รายงานวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 89 น.
- นิลุบล ทวีกุล, ทักษิณา ศันสยะวิชัยม กาญจนา กิรศักดิ์, ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, นฤทัย วรสถิต และ เพียงเพ็ญ ศรวัต. 2555. การจัดการโรคใบขาวอ้อยด้วยการใช้พันธุ์ปลอดโรค. น. 241-248. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3.
- รกรอง หอมหวล สุภาพร กลิ่นคง และประเสริฐ ฉัตรวชิระวงษ์ .2542. รายงานการวิจัยพัฒนาและวิศวกรรมฉบับสมบูรณ์ เรื่องการผลิตท่อนพันธุ์อ้อยให้มีคุณภาพและปราศจากโรคใบขาวโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- สุภาพร กลิ่นคง พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทัศน์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืชบางชนิดที่พบในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 35 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540.
- Bekele, B., Abeyasinghe, 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.
- Macone, 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.

Yang, S.L. and Y.S. Pan. 1969. Ecology and morphology of *Epitettix hiroglyphicus* Matsumura. Rept. Taiwan Sugar Exp.Sta. 48: 25-35.