บทนำ

อ้อยเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อประชาคมโลก ทั้งในด้านการเป็นวัตถุดิบของอุตสาหกรรมน้ำตาล เอธานอลซึ่งเป็นพลังงานทดแทน และเชื้อเพลิง การผลิตอ้อยในประเทศไทยมีความสำคัญต่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ โดยเป็นแหล่งสร้างงานการเกษตรและแรงงานไทยนับล้านคน สามารถสร้างรายได้จากการจำหน่ายน้ำตาลในประเทศปีละกว่าสองหมื่นล้านบาท และส่งออกมูลค่ามากกว่าปีละห้าหมื่นล้านบาท พื้นที่การผลิตอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคเหนือตามลำดับ รวมพื้นที่เพาะปลูกทั้งประเทศของปีการผลิต 2550/2551 มีจำนวน6.2 ล้านไร่ เก็บเกี่ยวได้ผลผลิตรวม 73.2 ล้านตัน จากการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกใหม่ประมาณ 2 ล้านไร่ ขณะที่เมื่อคิดเป็นผลผลิตเฉลี่ยก็ยังคงอยู่ในระดับ 9-11 ตัน/ไร่เช่นเดิม ซึ่งจัดว่าต่ำกว่าประเทศคู่แข่งเช่นบราซิลและออสเตรเลีย ที่ได้ผลผลิตเฉลี่ยสูงถึง 13-16 ตัน/ไร่ (ศูนย์สถิติทางการเกษตร, 2538; กลุ่มสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทราย, 2551http://www.ocsb.go.th/CloseProductSugar.aspx?ProductDate=IsNull&ProductYear=2550/51%20) ทั้งนี้ปัญหาที่สำคัญมากประการหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับอ้อยในประเทศไทย คือการระบาดของโรคใบขาวของอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ถือเป็นตัวแปรหลักต่อผลผลิตอ้อยในแต่ละปี โดยพบการลดลงเป็นอย่างมากของผลผลิตเฉลี่ยทั้งประเทศเมื่อมีการระบาดของโรค ซึ่งไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลยจำนวนหลายแสนไร่การผลิตอ้อยในแต่ละปีจึงมีความเสี่ยงค่อนข้างมาก ทั้งยังมีภาระการลงทุนค่าใช้จ่ายและแรงงานสูงมาก จากการต้องหาพื้นที่ปลูกใหม่เพื่อเลี่ยงการเกิดโรคและการจัดหาท่อนพันธุ์ใหม่ตลอดเวลา โดยที่ไม่สามารถไว้ตอต่อไปได้หลายปีดังเช่นประเทศผู้ผลิตอ้อยรายใหญ่อื่นๆของโลก อีกทั้งจวบจนปัจจุบันยังไม่พบว่ามีพันธุ์อ้อยต้านทานต่อโรคใบขาว การป้องกันกำจัดเท่าที่สามารถทำได้คือการจัดหาท่อนพันธุ์ปลอดโรคและการสร้างระบบเฝ้าระวังการเกิดโรค ซึ่งจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจสอบที่ทรงประสิทธิภาพด้วยความรวดเร็วทันการ ทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณเพื่อมิให้เกิดการอุบัติซ้ำของโรค สำหรับการตรวจโรคแต่เดิมนั้นดูจากอาการที่ปรากฏ ที่อาจสายเกินไปสำหรับการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างทันท่วงที

ในส่วนของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยนั้น จัดเป็นเชื้อโรคประเภท obligate parasite ที่อาศัยอย่างจำกัดตนอยู่ในท่อลำเลียงอาหารของพืช และในต่อมน้ำลาย ท่อน้ำลาย ทางเดินอาหารและช่องว่างลำตัวของเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (*Matsumuratettix hyroglyphicus*) ซึ่งเป็นแมลงพาหะ ปัจจุบันยังไม่สามารถทำการแยกเชื้อออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกเพื่อตรวจสอบลักษณะสมบัติและพฤติกรรมต่างๆได้ การวินิจฉัยว่าเป็นโรคหรือไม่นั้นแต่เดิมจึงต้องรอกระทั่งต้นอ้อยปรากฏอาการที่เป็นใบสีขาวออกมาเสียก่อนทำให้สายเกินการ นอกจากนี้เชื้อชนิดนี้ยังมีขนาดเล็กยิ่งกว่าแบคทีเรีย โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 60 x 300 นาโนเมตร (Shikata *et al.*, 1969) จึงไม่สามารถตรวจดูเชื้อภายในเนื้อเยื่อพืชได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ทั่วไป หากต้องการ

ตรวจสอบความมีอยู่ของเชื้อในพืชก็จำเป็นต้องต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้ยากต่อการตรวจเชื้อเป็นอย่างมาก ในระยะแรกของการศึกษาวิจัยวิธีตรวจวินิจฉัยเพิ่มเติมจากการสังเกตอาการของโรค ยังต้องอาศัยวิธีการทางอ้อม คือใช้การย้อมสีเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารแล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ด้วยสีย้อมชนิดพิเศษเช่น สี Dienes' stain (Deeley *et al.*, 1979) สี aniline blue สี 4',6-diamidino-2-phenylindole (Hituki, 1976) เพื่อช่วยตรวจสิ่งที่คาดว่าเป็นกลุ่มก้อนของไฟโตพลาสมาหรือสิ่งที่เป็นผลผลิตจากการติดเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งวิธีการเหล่านี้แม้ดูเหมือนง่ายแต่ก็ต้องอาศัยประสบการณ์ ทักษะและความชำนาญไม่น้อย และยังเป็นเพียงวิธีที่บ่งถึงความเป็นไปได้ที่ต้นอ้อยอาจมีการติดเชื้อไฟโตพลาสมา แต่ไม่สามารถอธิบายรายละเอียดอื่นๆเพื่อยืนยันชนิดเชื้อและการติดเชื้อที่แท้จริงได้

สำหรับการศึกษาวิจัยวิธีการวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อย และการตรวจเชื้อสาเหตุโรคโดยคณะผู้วิจัยที่เกี่ยวข้อง ได้มีความพยายามศึกษาเกี่ยวกับการติดเชื้อโรคใบขาวของอ้อย ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแ่ละกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง ประกอบกับวิธี DNA dot blot hybridization และวิธีพีซีอาร์ (พรทิพย์, 2542; Wongkaew *et al.*, 1995, Nakashima *et al.*, 1999) ซึ่งการวิจัยแนวทางการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระยะแรก ทำให้ได้แนวทางการตรวจเชื้อโรควิธีดีเอ็นเอโพรบแบบ dot blot hybridization ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจจำเพาะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นส่วนของ extrachromosomal DNA และ chromosomal DNA จากวิธี random cloned DNA fragment และที่เป็น ribosomal DNA probes จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16S rDNA และ 16S-23S rDNA spacer gene ซึ่งก็สามารถนำมาใช้ตรวจสอบการติดเชื้อได้เป็นอย่างดี (พรทิพย์และคณะ, 2541, Nakashima *et al.*, 1994; Namba *et al.*, 1993; Wongkaew *et al.*, 1995) แต่การตรวจเชื้อแบบ DNA dot blot hybridization ประกอบด้วยการเตรียมการทั้งเครื่องมือและสารเคมีหลายขั้นตอนซึ่งยังค่อนข้างยากต่อการทำงาน ต้องใช้เวลานานนับสัปดาห์สำหรับการเตรียมชิ้นงานจนถึงการแสดงผล จึงมีการวิจัยเทคนิคการตรวจโดยวิธีพีซีอาร์ ที่ใช้หลักการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำปฏิกิริยา polymerase chain reaction จากดีเอ็นเอต้นแบบ(DNA template) การตรวจดีเอ็นเอโดยวิธีนี้มีความแม่นยำและความไวสูงกว่าในเวลาที่รวดเร็วกว่าวิธี DNA dot blot hybridization คือใช้เวลาประมาณ 2 วันก็ทราบผล สามารถช่วยให้ตรวจพบเชื้อโรคในพืชและในแมลงพาหะได้ดียิ่งขึ้น พร้อมกับค่าใช้จ่ายในการตรวจที่สูงขึ้นตามต้นทุนวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี (พรทิพย์, 2542ก, 2542ข, 2544; Wongkaew *et al.*, 1996, 1997; Wongkaew and Fletcher, 2004) อย่างไรก็ตามในการดำเนินการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีวิธีการตรวจโรคที่แม่นยำสูงด้วยความไวยิ่งยวดและทราบผลอย่างรวดเร็วมากที่สุด ขณะที่แม้วิธีพีซีอาร์มาตรฐานซึ่งใช้ตรวจเชื้อโรคชนิดต่างๆกันอยู่ในปัจจุบัน ยังมีราคาสูงทั้งไม่รวดเร็วและสะดวกเท่าที่ต้องการ จึงเริ่มมีการศึกษาวิธีการอื่นๆที่อาจให้ประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น ซึ่งแนวคิดที่ได้รับความสนใจมากที่สุด

ได้แก่แนวคิดการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติทางเคมีไฟฟ้าของดีเอ็นเอ ที่สามารถนำมาเป็นไบโอเซนเซอร์สำหรับการพิสูจน์สมบัติทางชีวภาพต่างๆได้เป็นอย่างดี

การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาดีเอ็นเอเซนเซอร์แบบต่างๆ มีความก้าวหน้าตามลำดับ ทำให้เชื่อว่าจะสามารถนำมาใช้ในทางปฏิบัติได้จริงในไม่ช้า(Wang *et al.,* 1998; Berggren *et al.,* 1999; Gooding, 2002; Drummond *et al.,* 2003; Lubin *et al.,* 2006; Lu *et al.,* 2008; Wongkaew and Poosttisak, 2008) มีการนำเสนอเทคนิคประกอบต่างๆเพื่อการนี้อย่างหลากหลาย แต่เทคนิคที่ค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดขณะนี้ได้แก่ดีเอ็นเอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า ด้วยความสามารถในการแสดงผลและวิเคราะห์โดยวิธีเคมีไฟฟ้า จากผลของปฏิกิริยาในกระบวนการจดจำและจับคู่ได้อย่างเฉพาะเจาะจงของสารชีวโมเลกุลดังเช่นดีเอ็นเอเป็นต้น โดยการชักนำให้เกิดการจับคู่ของดีเอ็นเอบนผิวอีเล็กโทรดและตรวจผลของปฏิกิริยาทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธีต่างๆเช่น Cyclic Voltammetry, Differntial Pulse Voltammetry, และ Amperometry (Hianik *et al.,* 2001; Cai *et al.,* 2002; Drummond *et al.,* 2003; Suye *et al.,* 2005) ความเสถียรของดีเอ็นเอเซนเซอร์และความไวของการแสดงผลขึ้นอยู่กับเทคนิคการตรึงดีเอ็นเอบนผิวอิเล็กโทรด และสารประกอบที่ใช้ในการช่วยเพิ่มสัญญาณการแสดงผลปฏิกิริยา รวมทั้งวิธีการตรวจทางเคมีไฟฟ้า ขณะที่ความเที่ยงตรงหรือความเฉพาะเจาะจงของการตรวจสอบ ขึ้นอยู่กับการเลือกชนิดดีเอ็นเอตัวตรวจและเทคนิคการทำปฏิกิริยาจับคู่ของดีเอ็นเอคู่สม (DNA hybridization) สำหรับการทดลองใช้ดีเอ็นเอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า เพื่อตรวจสอบทางด้านพันธุกรรมตลอดจนการวินิจฉัยโรคและการตรวจเชื้อโรค พบว่าสามารถดำเนินการอย่างได้ผลในกรณีศึกษาต่างๆเป็นจำนวนมากเช่น การตรวจยีน Cecropin *CM4* ขนาด 108 เบส ด้วยการตรึงดีเอ็นเอบน cysteine modified gold electrode และตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Differential Pulse Voltammetry โดยใช้สาร Hoechst 33258 เป็นดัชนีแสดงผลปฏิกิริยาการจับคู่ของดีเอ็นเอ(Fan *et al.,* 2000) การตรวจ DNA polymorphisms ของยีน *CYP3A4* โดยการตรึงและตรวจปฏิกิริยาจับคู่ดีเอ็นเอบน gold electrode (Leonel *et al.,* 2003) การตรวจหายีน BAR ในข้าวโพดตัดแต่งพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน และยีน CP4 Epsps ในถั่วเหลืองตัดแต่งพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีน จากการวัดปฏิกิริยาเคมีไฟฟ้าในสารละลาย methylene blue โดยวิธี Differential Pulse Voltammetry ด้วย stearic acid-modified carbon paste electrode ที่ใช้ตรึงดีเอ็นเอ (Ren *et al.,* 2003) การตรวจหาความเสียหายของคู่สายดีเอ็นเอที่เกิดจากสารก่อมะเร็งจำพวก styrene oxide จากการตรึงดีเอ็นเอบน polystyrene sulfonate – poly(diallyldimethyl ammonium) modified pyrolytic graphite electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าในสารละลาย methylene blue โดยวิธี Cyclic Voltammetry (Zhang and Hu 2007) การตรวจดีเอ็นเอของเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* และไวรัสตับอักเสบชนิด B (hepatitis B) โดยการตรึงและจับคู่บน carbon paste electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธี Chronopotentiometry โดยใช้ $Co(phen)^{+3}_3$ เป็นดัชนีแสดงผลปฏิกิริยาซึ่งสามารถตรวจปริมาณต่ำสุดได้ 3.4 nmole/l (Wang *et*

al., 1997; Erdem *et al.*, 1999) หรือตรวจดีเอ็นเอไวรัสตับอักเสบชนิด B โดยการตรึงและจับคู่บน glassy carbon electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าด้วยวิธี AC impedance โดยใช้ $[Os(bpy)2Cl2]^{+}$ เป็น ดัชนีแสดงผลปฏิกิริยา (Zhao and Ju 2004) และการตรวจดีเอ็นเอขนาด 18-244 เบส ของไวรัสตับอักเสบชนิด C (hepatitis C) ด้วยการตรึงและจับคู่บน polypyrrole-modified microelectrode ซึ่งสามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างน้อยที่สุด 1.82×10^{-21} mole/ml จากการวัด Cyclic Voltammetry และ Constant Potential Amperometry (Riccardi *et al.*, 2008) การตรวจยีน *invA* ที่แสดงออกถึงความรุนแรงของเชื้อแบคทีเรีย Salmonella จากการตรึงดีเอ็นเอที่ผิว carbon paste electrode และตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Amperometry โดยใช้ pyrroquainolinequinone-glucose dehydrogenase ติดฉลากดีเอ็นเอตัวตรวจเพื่อช่วยเพิ่มสัญญาณการแสดงผล(Ikebukuro *et al.*, 2002) การตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *Microcystis* spp. จากการตรึงดีเอ็นเอที่ผิว carbon paste electrode และตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Cyclic Voltammetry และ Differential Pulse Voltammetry ในสารละลาย methylene blue (Erdem *et al.*, 2002) การตรวจดีเอ็นเอสายสั้นของเชื้อไวรัสเอดส์ HIV-1 และเชื้อวัณโรค Mycobacterium ด้วยการตรึงและจับคู่บน N-[6-(thien-3-yl) acetotoxy]-pyrrolodine-2,5-dione modified gold electrode ซึ่งตรวจพบปริมาณต่ำสุดที่ 2×10^{-9} mole/l โดยวิธี Cyclic Voltammetry (Peng *et al.*, 2002) การทดลองตรวจดีเอ็นเอขนาด 1.35×10^{7} คู่เบสของยีสต์จากการตรึงดีเอ็นเอที่ผิว carbon paste electrode และตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Cyclic Voltammetry ในสารละลาย ferroceneum (Ju *et al.*, 2004) การตรวจเชื้อไวรัส SAR (severe acute respiratory syndrome) ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจที่ติดฉลากสาร sodium aurothiomalate โดยการตรึงและจับคู่บน glassy carbon electrode แล้วตรวจผลทางเคมีไฟฟ้าวิธี Cyclic Voltammetry ซึ่งช่วยให้สามารถตรวจพบและแยกแยะดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ในระดับ 3 เบส (three-based mismatch oligonucleotide) จากตัวอย่างปริมาณ 15 fmole ใน 30ul (de la Escosura-Muniz *et al.*, 2007) การตรวจเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆที่เป็นสาเหตุโรคของระบบท่อปัสสาวะได้แก่ *Enterococus faecalis, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, pseudomonas aeruginosa,* และ *Proteus mirabilis* ด้วยดีเอ็นเอตัวตรวจชนิด16S rDNAติดฉลาก horseradish peroxidase-anti-fluorescein monoclonal Fab conjugate ที่ตรึงบน alkenethiolate-modified gold electrode แล้วตรวจวัดผลทางเคมีไฟฟ้าโดยวิธี Amperometry (Liao *et al.*, 2007) เหล่านี้เป็นต้น จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะสามารถนำวิธีการทางเคมีไฟฟ้าดังกล่าว มาประยุกต์ใช้สำหรับการตรวจเชื้อโรคใบขาวของอ้อย เพื่อให้ได้วิธีการที่ตรงกับความต้องการของทุกฝ่าย ที่ต้องการทั้งความแม่นยำเที่ยงตรง ความไวยิ่งยวด ความรวดเร็ว ความสามารถในการให้บริการในปริมาณมากทั้งในสภาพไร่และในห้องปฏิบัติการ พร้อมๆไปกับความประหยัด ความสะดวก ความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม