

## การตรวจเอกสาร

โรคเส้ด้าอ้อย (smut) เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตอ้อย มีรายงานการพบโรคครั้งแรกเมื่อ ค.ศ. 1877 ที่ Natal ประเทศแอฟริกาใต้ เริ่มระบาดรุนแรงแพร่กระจายในอินเดียและประเทศต่าง ๆ ในทวีปเอเชีย (Agnihotri, 1983) ให้ความเสียหายให้กับประเทศไทยครั้งแรกใน ค.ศ. 1964 (Martin, 1964) ให้ความเสียหายให้กับอ้อยปลูกพันธุ์การค้าในทุกแหล่งปลูกของประเทศ

### เชื้อสาเหตุ

โรคเส้ด้าอ้อยมีสาเหตุจากเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Syd. เชื้อราจัดจำแนก (นิวัต, 2543) อยู่ใน

Phylum Basidiomycota

class Basidiomycetes

Subclass Phragmobasidiomycetes

Order Ustilaginales

Family Ustilaginaceae

Genus *Ustilago*

Species *scitaminea*

เชื้อมีการสร้าง teliospore หรือ chlamydospore ลักษณะกลม (globose) จนถึงค่อนข้างกลม (subglobose) สีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ขอบสีน้ำตาล ผิวมีหนามเล็ก ๆ สปอร์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.2-10 ไมโครเมตร โดยเฉลี่ย 7.5 ไมโครเมตร งอกให้ promycelium ลักษณะเป็นแท่งปลายมน ขนาด 2.5-5 × 20-35 ไมโครเมตร มีผนังแบ่งตามขวาง 2-4 เซลล์ แต่ละเซลล์สามารถงอกให้ basidiospores หรือ sporidia โดยงอกที่ปลายหรือด้านข้างเดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม sporidia เป็นแท่งปลายมนรูปไข่ โสอบ ขนาด 2.0-3.0 × 7.6-13.5 ไมโครเมตร และ promycelium มีการแตกหน่อ (budding) ให้ sporidia ได้อีก (ธนาคร และคณะ, 2526) วงจรชีวิตของเชื้อจะประกอบด้วยเซลล์ 3 แบบ (Shenck, 1999) คือ

1. teliospore ( $n+n$ ,  $2n$ ) เป็นระยะของเชื้อที่สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ เมื่อแก่เต็มที่จะรวมนิวเคลียสให้อยู่ในสภาพ diploid ( $2n$ ) งอก germ tube หรือ hypobasidia แบ่งเซลล์แบบ meiosis ได้ haploid cells จำนวน 4 เซลล์และสร้าง probasidium บน haploid cells ( $n$ ) แต่ละเซลล์จากนั้นจึงพัฒนาเป็น basidiospore หรือ sporidia จำนวน 4 สปอร์

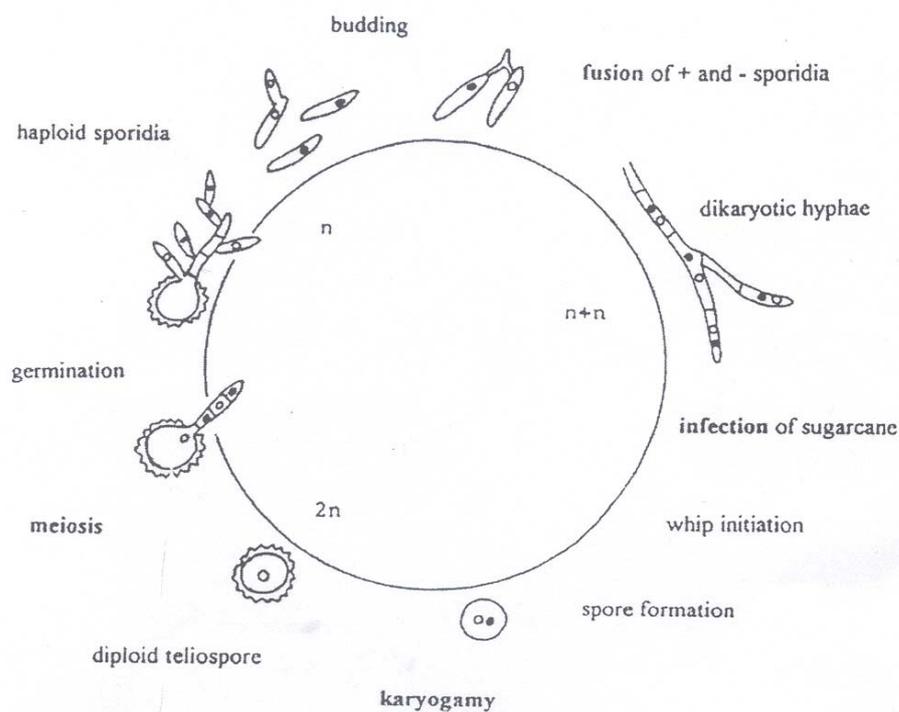
2. basidiospore หรือ sporidia ( $n$ ) เป็นสปอร์ที่มีโครโมโซม 1 ชุด (haploid basidiospore =  $n$ ) มีรูปร่างรี สามารถแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis แล้วเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อ (budding) คล้ายยีสต์ (yeast-like spore)

3. dikaryotic mycelium ( $n+n$ ) เป็นเส้นใยที่มีการเชื่อมเซลล์ (cell fusion) ได้เป็นเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส หรือกระบวนการ dikaryotization สามารถเกิดได้ 3 แบบดังนี้

3.1 sporidial fusion เกิดเมื่อ sporidia งอก germ tube สั้น ๆ ออกมาซึ่งยังไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้จากนั้น germ tube จากต่าง mating type เกิดการเชื่อมเซลล์กันแล้วจะได้เป็น dikaryotic cell แล้วเจริญเป็นเส้นใยที่มี 2 นิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ที่สามารถเข้าทำลายพืชได้

3.2 promycelium cell fusion หลังจากที sporidia งอก promycelium ได้ประมาณ 6 ชั่วโมง แล้วสร้าง tubular out growth บาง ๆ เป็น infection thread ที่ยังเป็น haploid cell เมื่อสัมผัสกับ promycelium จากต่าง mating type ณ จุดสัมผัสนั้นผนังเซลล์จะถูกละลายออก cytoplasm และนิวเคลียสจากทั้งสองเซลล์เคลื่อนเข้าหากันและงอกเป็น dikaryotic mycelium แต่ไม่มีการสลัด promycelium ทิ้ง ในบางครั้ง promycelium อาจสัมผัสกับเส้นใยที่ไม่ได้มาจาก sporidia โดยตรงแล้วเคลื่อนย้าย cytoplasm และนิวเคลียสสร้าง septate กันเป็น dikaryotic cell แต่ไม่มีการเชื่อมกับ hypha

3.3 hyphal fusion เกิดขึ้นโดย hypha จากต่าง mating type เกิดการเชื่อมเซลล์สร้างเป็น dikaryotic hypha เจริญอยู่ระหว่างเซลล์พืชและก่อโรคในพืชได้ (pathogenic cell type) (Shenck, 1999)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเชื้อรา *Ustilago scitaminea*

ที่มา: Shenck (1999)

### ลักษณะอาการของโรค

โรคเส้ด้าอ้อยสามารถพบได้ในแปลงปลูกอ้อยก่อนโรคอื่น ๆ เนื่องจากสามารถมองเห็น ส่วนของ sorus ที่มีลักษณะคล้ายเส้ด้า ซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งจากยอดหรือตาข้างของลำต้น ความยาวของเส้มีตั้งแต่ไม่กี่เซนติเมตรจนถึง 1.5 เมตร (Jack *et al.*, 1983) และมี teliospore ของเชื้ออ้อย อยู่ในอุกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อบาง ๆ สีขาว (Koike *et al.*, 1981) นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว อาการผิดปกติอื่น ๆ ที่พบเห็นได้ทั่วไป ประกอบด้วย อาการ sorus บิดเบี้ยวที่เกิดจากตาข้าง ลำต้นเจริญผิดส่วน ลำต้นเกิดปุ่มปม และเกิดแคลลัส ลำต้นแตกตามากมาย (Byther and Steiner, 1974)

### การเข้าทำลายและการแพร่กระจาย

โรคเส้ด้าอ้อยนั้นโดยพื้นฐานแล้วเป็นโรคที่เกิดกับเนื้อเยื่อเจริญ (meristem tissue) จากนั้นจะแพร่ขยายไปยังเนื้อเยื่อเจริญส่วนที่ยังอ่อนอยู่ โดยเข้าสู่อ้อยปกติทางตาข้าง (lateral buds) และเจริญปกคลุม bud scale เมื่อตาที่ถูกเชื้อเข้าทำลายงอก เชื้อราก็จะเจริญงอกตามไปด้วย (Duttamajumder, 2000) teliospore ของเชื้อจะแพร่กระจายไปได้โดยอาศัยลม (Akalach and Touil, 1996) ติดอยู่ในดิน และติดไปกับท่อนพันธุ์ (เลิศวิทย์, 2534) สปอร์ของเชื้อจากอ้อยที่เป็นโรคสามารถแพร่กระจายโดยลมจากต้นที่เป็นโรคทำให้ต้นอ้อยปกติเป็นโรคได้ในระยะ 11.1 - 16.5 เมตร (Hoy and Grisham, 1988)

### ความเสียหาย

ความเสียหายของผลผลิตจะเกิดได้หลากหลายขึ้นอยู่กับระดับความต้านทานของอ้อย อ้อยที่เป็นโรคจะมีความเสียหายทั้งผลผลิตและน้ำหนัก โดยพบว่าเมื่ออ้อยเกิดโรคมากกว่า 30 % ในอ้อยพันธุ์ที่อ่อนแอมากต่อโรคจะสูญเสียผลผลิต 24.64 % (Rajesh *et al.*, 2003) และการเพิ่มขึ้นของโรคเส้ด้าทุก ๆ 1 % ในแปลงปลูก ผลผลิตจะลดลง 1.68 ตัน/เฮกตาร์ (Natarajan and Kalaimani, 1996) และจะเกิดโรครุนแรงมากในอ้อยต่อ ในการเกิดโรคระยะแรกจะมีเพียงเล็กน้อยคือ จำนวนเส้ด้าต่ำกว่า 100 เส้ด้า/เฮกตาร์ ในปีแรก แต่จะเพิ่มขึ้นมากกว่า 5,000 เส้ด้า/เฮกตาร์ ในอีก 2 ปีต่อมา (Akalach and Touil, 1996)

### การควบคุมโรค

Vala *et al.* (1992) รายงานว่าการควบคุมโรคโดยการจุ่มท่อนพันธุ์ในน้ำที่มีส่วนผสมของ Emisan (2- methoxyethyl mercury chloride) 250 ppm ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีสามารถควบคุมโรคได้ดี

Olufolaji (1993) รายงานการจุ่มท่อนพันธุ์ก่อนปลูกในสาร captafol (Captafol 60) ปริมาณ 1 กรัม สารออกฤทธิ์/ลิตร สามารถควบคุมโรคได้ดี

Vijaya (2000) รายงานการจุ่มท่อนพันธุ์ในสารเคมี tridemorph 0.1 % เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สามารถควบคุมโรคเส้ด้าได้ดีและสามารถควบคุมโรคได้ดีตลอดฤดูกาลปลูกอ้อย

Muthukrishnan *et al.* (1991) รายงานว่า การเกิดโรคแฉ้ดำจะลดลงถ้าทำการตากดินให้แห้งก่อนปลูกอ้อย 15 วันและจุ่มท่อนพันธุ์ใน 0.05 % carbendazim เป็นเวลา 5 นาที ก่อนปลูก สามารถควบคุมโรคได้ถึง 70 %

Abd –Elrasoul *et al.* (1991) การควบคุมโรคโดยแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมโรค

### สายพันธุ์ของเชื้อ

Alexander (1981) ศึกษา teliospore จาก 46 แห่งที่เก็บจากพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อย ทำการปลูกเชื้อทดสอบในอ้อย 9 สายพันธุ์ ผลจากปฏิบัติการทำให้ทราบว่าเชื้อรา *U. scitaminea* มี 2 race และหลาย biotypes

### วิธีการปลูกเชื้อ

การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อทดสอบปฏิกิริยาของอ้อยที่แสดงต่อเชื้อ เพื่อให้อ้อยเกิดอาการของโรคได้อย่างรวดเร็ว และทดสอบปฏิกิริยาต้านทานของอ้อยต่อเชื้อ *U. scitaminea* นั้นมีวิธีการศึกษาหลายวิธี เช่น จากการศึกษาของสุนิตย์(2524) พบว่าการฉีด chlamyospore suspension หรือ sporidia suspension เข้มข้น  $10^6-10^7$  สปอร์ต่อน้ำ 1 มิลลิลิตร บริเวณ growing point ของต้นอ้อยอายุ 1 สัปดาห์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ติดต่อกัน 5 ครั้ง สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทำให้อ้อยเป็นโรคดีที่สุด อ้อยเริ่มแสดงอาการของโรค หลังจากปลูกเชื้อ 2 เดือน หรือการทดลองของ Mohanraj *et al.* (1987) ที่กล่าวว่า การฉีด teliospore ของเชื้อความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร เข้าสู่บริเวณตรงกลางของตาอ้อย จะแสดงอาการของโรคได้รวดเร็วที่สุด แต่การทดสอบโดยการทำแผลท่อนพันธุ์และแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension ความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จะทำให้อ้อยแสดงอาการของโรคโดยความสูงของต้นอ้อยจะลดลงและการเกิดแฉ้จะใช้เวลานาน

### การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแสดำอ้อย

จากลักษณะการเจริญของเชื้อรา *U. scitaminea* อ้อยที่ได้รับการปลูกเชื้อหรือถูกเชื้อเข้าทำลาย เชื้อมีการเจริญและพัฒนาภายในต้นอ้อย ต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการของโรคคือการสร้างแสดำนั้นจะใช้เวลานานกว่าเชื้อจะต้องมีปริมาณมากพอที่จะทำให้ต้นกล้าอ้อยแสดงอาการของโรคขึ้น คือหลังจากเชื้อเข้าทำลายอ้อยเป็นเวลามากกว่า 2 เดือนขึ้นไป หรืออาจพบเห็นโรคในระยะอ้อยโต การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อในอ้อยก่อนการสร้างแสดำจึงเป็นวิธีการหนึ่งในการตรวจสอบปฏิกิริยาของอ้อยต่อเชื้อ และลดระยะเวลาในการทดสอบพันธุ์เพื่อการคัดพันธุ์ต้านทาน จึงมีการศึกษาถึงวิธีการในการตรวจเชื้อก่อนการที่ต้นอ้อยจะแสดงอาการ ซึ่งมีการศึกษาไว้หลายวิธี ได้แก่ การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อโดยใช้สีย้อม trypan blue ย้อมสีเชื้อบริเวณ nodal bud พบว่าสีย้อมสามารถย้อมสีเส้นใยของเชื้อได้ภายใน 4 ชั่วโมงหลังทำการปลูกเชื้อ และตรวจพบเชื้อเฉพาะในต้นอ้อยที่เป็นโรคแต่ไม่พบในอ้อยปกติ (Sinha *et al.*, 1982)

นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ โดยการพัฒนาไพรเมอร์ *bE4* และ *bE8* ในการเพิ่มปริมาณยีน *bE* ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเส้นใยในระยะ dikaryon ที่สามารถเข้าทำลายอ้อยได้ (Albert and Schenck, 1996) จากนั้นจึงมีการศึกษาในขั้นตอนต่อไป Schenk (1998) ศึกษาการตรวจสอบการเกิดโรคแสดำอ้อยด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ได้ในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อ และการวิเคราะห์ผล PCR สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การสร้างแสดำในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง และยืนยันว่า PCR มีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบเส้นใยของเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจสอบการเกิดโรคด้วยเทคนิค PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *U. scitaminea* ในขณะที่ต้นอ้อยยังไม่แสดงอาการของโรคได้ Singh *et al.* (2004) ตรวจสอบการเกิดโรคแสดำด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถตอบสนองได้เป็นอย่างดีต่อเชื้อสาเหตุ การปลูกเชื้อเพียงเล็กน้อยด้วย 10 sporidia หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก็สามารถตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้ และการวิเคราะห์ PCR ยังสามารถตรวจสอบ sporidia ที่เป็น single mating-type ได้ และยังได้ยืนยันอีกด้วยเช่นกันว่า การตรวจสอบการเกิดโรคด้วยวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

### การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *U. scitaminea*

จากการศึกษาวิธีการควบคุมป้องกันการเกิดโรคแสด้าอ้อยนั้น พบว่าวิธีการป้องกันโรค โดยใช้อ้อยพันธุ์ต้านทานนั้นเป็นวิธีการที่ดีที่สุด (Ferreira and Comstock, 1989) มีประสิทธิภาพดี และเกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้สะดวก แต่อย่างไรก็ตามมักพบเสมอว่าข้อดีของพันธุ์ต้านทานที่มีนั้นคงอยู่ได้ไม่นาน (breakdown of resistance) เนื่องจากเชื้อโรคมักมีการปรับตัวเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (mutation) จากสายพันธุ์เชื้อที่อ่อนแอเป็นสายพันธุ์ที่รุนแรง สามารถเข้าทำลายพันธุ์ต้านทานที่มีอยู่เดิมได้ (รังสฤษดิ์, ม.ป.ป.) การศึกษาพันธุกรรมของเชื้อเพื่อจัดกลุ่มแบ่งสายพันธุ์จึงมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อให้ทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อสำหรับเป็นข้อมูลในการพัฒนาอ้อยพันธุ์ต้านทานต่อไป

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นอีกวิธีการหนึ่ง เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต และถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายประจำตัวของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเป็นความแตกต่างของสารพันธุกรรมที่ถ่ายทอดไปยังลูกหลานโดยตรง (Weising *et al.*, 1995) ในต่างประเทศได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นมาเป็นจำนวนมาก ไม่ว่าจะเป็น hybridization-based marker เช่น restriction fragment length polymorphism (RFLP) หรือ polymerase chain reaction (PCR) – base marker amplified polymorphic DNA (RAPD) เพื่อนำไปใช้ในการสร้างไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับตรวจสอบและจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต

การศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา *U. scitaminea* ในประเทศไทย จากการศึกษาของศิริลักษณ์ (2547) ทำการเก็บรวบรวมเชื้อราจากแหล่งปลูกอ้อย 7 แหล่ง ในจังหวัด ชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี และชลบุรี ศึกษาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore ของเชื้อในแต่ละแหล่งไม่แตกต่างกัน และเมื่อศึกษาการเจริญเติบโตและรูปร่างโคโลนีในแต่ละไอโซเลทบนอาหาร V8 juice agar (VA) พบว่าเมื่อเชื้อมีอายุ 15 วัน สามารถจัดกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ตามขนาดและแบ่งกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 5 กลุ่ม สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ A-07, A-09, G-08 และ G-10 พบว่าเชื้อรา 70 ไอโซเลท จาก 7 แหล่ง พบเชื้อรา *U. scitaminea* จากจังหวัดชัยภูมิ, นครราชสีมา, บุรีรัมย์, กาฬสินธุ์ และอุดรธานี สามารถจัดกลุ่มตามแหล่งที่มาได้อย่างชัดเจน ชี้ให้เห็นว่า เชื้อราทั้ง 5 จังหวัดมีความผันแปรกันน้อย ส่วนเชื้อราจากจังหวัดขอนแก่นและชลบุรี ไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน แสดงว่าเชื้อราจากทั้งสองจังหวัดมีความผันแปรสูง สรุปได้ว่าการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด โดยวิธี RAPD สามารถแยกกลุ่มบางไอโซเลทตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่างและความผันแปรทางพันธุกรรมมีความ

สัมพันธ์น้อยมากกับลักษณะทาง phenotype ที่ประกอบด้วยการเจริญเติบโต ลักษณะโคโลนี และความสามารถในการทำให้เกิดโรค

สำหรับในต่างประเทศมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *U. scitaminea* ในหลายพื้นที่ Singh et al. (2005) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่รวบรวมได้จาก South Africa, Reunion Island, Hawaii, Guadeloupe โดยเทคนิค RAPD และสรีรวิทยาของเชื้อ ไม่พบความแตกต่างกันของทั้งลักษณะสรีรวิทยาของเชื้อและเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC 220, UBC 222, UBC 230, T7 และ K5 ในประเทศจีน Xu et al. (2004) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *U. scitaminea* จำนวน 18 ไอโซเลท ที่เก็บได้จาก 6 แหล่งทั่วประเทศจีน แยกความแตกต่างโดยเทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ 13 ชนิด แบ่งเชื้อได้ทั้งสิ้น 6 กลุ่ม