วิจารณ์การทดลอง

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลก ในแง่สำหรับการบริโภค อ้อยมีความสำคัญเป็นอันดับ 4 รองจากข้าวสาลี ข้าวโพดและข้าว สำหรับประเทศไทย อ้อยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในระดับต้น ๆ ของสินค้าเกษตร เช่นเดียวกัน โดยอ้อยจัดเป็นพืชเศรษฐกิจรองจาก ข้าว ยางพารา และมันสำปะหลัง ผลผลิตอ้อยโดยหลักถูกแปรรูปออกมาในรูปของผลผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งในแต่ละปีทำรายได้เป็นจำนวนมหาศาลเข้าสู่ประเทศ ในปี 2546 ประเทศไทยส่งออกน้ำตาลจากอ้อย คิดเป็นมูลค่าโดยรวมเท่ากับ 38,432 ล้านบาท ประโยชน์ของอ้อยนอกจากในแง่ของการบริโภคแล้ว อ้อยยังสามารถนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้อีก เช่น ใช้ผลิตแอลกอฮอล์เป็นเชื้อเพลิง สำหรับเป็นพลังงานทดแทน ผลผลิตที่เหลือนอกจากนี้สามารถนำมาแปรรูปเป็นกระดาษ เฟอร์นิเจอร์ต่าง ๆ ผลผลิตอ้อยโดยรวมของโลกในปี 2547 มีประมาณ 1,257 ล้านตัน ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตอ้อยอันดับ 5 ของโลก รองจาก บราซิล อินเดีย จีน และเม็กซิโก ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 10.4 ตันต่อไร่ ในขณะที่ประเทศไทยผลผลิตอ้อยรวมในแต่ละปีอยู่ระหว่าง 40-60 ล้านตัน คิดเป็นผลผลิตเฉลี่ย 8-9 ตันต่อไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2547) ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับประเทศอื่น ๆ เป็นผลให้ประเทศไทยจะต้องเร่งพัฒนาระบบการผลิตอ้อยให้มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตอ้อยเท่าหรือมากกว่าประเทศผู้ผลิตอื่น ๆ ผลผลิตอ้อยในประเทศไทยจะเพิ่มผลผลิตได้จะต้องมีการจัดการที่เหมาะสม โดยมีปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตอ้อยได้แก่ พันธุ์ สภาพแวดล้อม สภาพพื้นที่ดิน ความอุดมสมบูรณ์ของดิน โรคและแมลง เป็นต้น

โรคที่สำคัญโรคหนึ่งที่มีผลต่ออ้อยในทั้งอ้อยปลูกและอ้อยตอได้แก่ โรคแส้ดำ สาเหตุจากเชื้อรา *U. scitaminea* พบระบาดทำความเสียหายให้กับอ้อยพันธุ์การค้า ในทุกแหล่งปลูกของประเทศ พบครั้งแรกในประเทศไทย ค.ศ. 1964 (Martin, 1964) อ้อยที่เป็นโรคจะแสดงอาการที่ส่วนยอดของลำต้นเป็นก้านแข็ง เล็กยาวคล้ายแส้สีดำ ในต้นที่เป็นโรครุนแรง จะแตกหน่อมากและแคระแกรน คล้ายกอตะไคร้ ทำความเสียหายให้กับผลผลิตอ้อยทั้งทางด้านผลผลิตและคุณภาพ อ้อยพันธุ์อ่อนแอ ชัยนาท 1 พบว่าผลผลิตลดลง 8-18% ขณะที่ความหวาน (CCS) ลดลง 7-13 CCS(วันทนีย์และคณะ, 2528) การควบคุมป้องกันการเกิดโรคสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี วิธีการเขตกรรม แต่การใช้พันธุ์อ้อยต้านทานจัดเป็นวิธีการที่ดีที่สุด (Ferreira and Comstock, 1989) เนื่องจากเป็นวิธีที่ประหยัด ไม่ก่อให้เกิดมลพิษและเกษตรยอมรับได้ นำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างสะดวกที่สุด ดังนั้นการพัฒนาพันธุ์อ้อยให้เกิดความต้านทานต่อโรคดังกล่าวจึงมีความสำคัญยิ่ง เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตอ้อยในประเทศไทย

ความต้านทานของอ้อยแต่ละพันธุ์สามารถศึกษาได้จากปฏิกิริยาของอ้อยต่อเชื้อที่เข้าทำลายอ้อย ซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาปฏิกิริยาของอ้อยต่อเชื้อโดยการปลูกเชื้อ การตรวจสอบการเจริญของเชื้อภายในต้น นอกจากนี้การศึกษาลักษณะสายพันธุ์เชื้อก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน เนื่องจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะก่อให้เกิดความรุนแรงของโรคที่แตกต่างกัน ข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้สำหรับการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานต่อโรคแส้ดำต่อไป

การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อพบว่าวิธีการปลูกเชื้อโดยการฉีด teliospore suspension เข้าไปในต้นกล้าอ้อย สามารถทำให้ต้นกล้าอ้อยเกิดโรคได้รวดเร็วที่สุด ต้นกล้าอ้อยแสดงอาการของโรค โดย สร้างแส้สีดำหลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน สอดคล้องกับการทดลองของสุวนิตย์ (2524) แม้ว่าการทดลองครั้งนี้จะทำการปลูกเชื้อจำนวนน้อยครั้งกว่า ส่วนการปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension ทำให้อ้อยเกิดโรคได้รุนแรงกว่าการปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension สอดคล้องกับสุวนิตย์ (2524) แต่แตกต่างจากศิริลักษณ์ (2547) ซึ่งรายงานว่าเมื่อทำการปลูกเชื้อด้วย sporidia มีการเกิดโรคมากกว่า การปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension การปลูกเชื้อโดยการฉีด teliospore suspension จัดว่าเป็นวิธีการที่สะดวกและรวดเร็วที่สุด ให้ผลสอดคล้องกับระดับความต้านทานของอ้อยพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในสภาพแปลงปลูกจริง ยกเว้นในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งไม่พบการเกิดแส้ดำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากอ้อยแต่ละพันธุ์มีกลไกความต้านทานโรคที่แตกต่างกัน การเจริญของ teliospore เมื่องอกจะสร้าง sporidia ที่มีทั้ง mating type + และ – สปอร์ที่อยู่ใกล้กันมีโอกาสผสมกันและเจริญพัฒนาเป็นเส้นใยได้ดีกว่าการปลูกเชื้อด้วย sporidia mixture เพราะการปลูกเชื้อด้วย sporidia ที่มี mating type ต่างกันมีโอกาสที่จะอยู่ใกล้ชิดกันได้น้อยกว่าและสปอร์มีความคงทนน้อยกว่า การเจริญของเชื้อที่จะสร้างเส้นใยจึงมีน้อย สำหรับวิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธีการอื่นที่ทำการทดสอบ ได้แก่ การทำแผลท่อนพันธุ์และแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension จัดเป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน อ้อยจะแสดงอาการของโรคได้ช้ากว่ามาก ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ต้นกล้าอ้อยเริ่มเกิดโรคหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน ส่วนการแช่ท่อนพันธุ์ใน sporidia suspension เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ไม่เกิดโรค ทั้งนี้อาจเนื่องจาก sporidia มีความคงทนน้อยกว่า อาจจะไม่สามารถอยู่รอดในน้ำได้นานถึง 24 ชั่วโมง ส่วนวิธีการที่แช่ท่อนพันธุ์ใน sporidia suspension 30 นาที พบการเกิดโรคในอ้อยพันธุ์ทดสอบได้

การปลูกเชื้อโดยการฉีด spore suspension เข้าไปในต้นกล้าจะพบอาการของโรคได้รวดเร็วกว่ามาก วิธีการดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานของอ้อยในแบบ biochemical และ physiological resistance ในขณะที่การปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์จะเกี่ยวเนื่องกับลักษณะการต้านทานของอ้อยในลักษณะ morphological resistance อีกด้วย(Mohonraj *et al.,* 1987)

ในการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อทั้ง 3 วิธี และใช้ส่วนขยายพันธุ์เชื้อที่แตกต่างกัน 2 ระยะ คือ teliospore และ sporidia พบว่า การปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีด teliospore suspension หรือ sporidia suspension วิธีการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension นาน 24 ชั่วโมง และการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension นาน 30 นาที แล้วบ่มไว้นาน 1 คืน สามารถทำให้เกิดโรคแส้ดำกับอ้อยพันธุ์ทดสอบได้ โดยให้ผลสอดคล้องกับระดับความต้านทานของพันธุ์อ้อย ยกเว้นในพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคโดยเฉพาะในระยะอ้อยตอ อย่างไรก็ตามในการศึกษาวิธีการปลูกเชื้อนั้น ในแต่ละวิธีมีข้อแตกต่างกัน โดยเฉพาะในวิธีที่ใช้ระยะเวลาสั้น มักจะเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดโรคได้รวดเร็วและรุนแรง ดังนั้นจะต้องมีการกำหนดระดับการตอบสนองของพืชต่อระดับความต้านทานโรคที่แตกต่างกันไป

จากปัจจัยของการเกิดโรคและความรุนแรงของโรค ประกอบด้วย เชื้อสาเหตุ พันธุ์พืช และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำ การเก็บรวบรวมเชื้อรา *U. scitaminea* จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย และทำการจัดกลุ่มเชื้อ โดยใช้ลักษณะต่าง ๆ พบว่า สามารถเก็บรวบรวมเชื้อได้ทั้งสิ้น 43 ไอโซเลท ซึ่งวิธีการเก็บเชื้อจะใช้วิธีการสุ่มเก็บในแปลงปลูก อำเภอละ 1 แปลง และแปลงละ 1 ไอโซเลท แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติไม่สามารถทำได้เช่นนั้น เนื่องจากในบางพื้นที่ไม่พบการระบาดของโรค เช่นในพื้นที่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์นั้นได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 6 แปลงปลูก พบอ้อยแสดงอาการของโรค สามารถเก็บตัวอย่างมาทำการทดสอบได้ตัวแทนเพียงแปลงเดียวเท่านั้น แต่ในขณะที่บางแหล่งปลูก มีการระบาดของโรคเป็นจำนวนมาก เช่น ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในเขตจังหวัดขอนแก่น ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 11 แปลงปลูก สามารถเก็บตัวอย่างโรคได้ในทุกแปลงปลูกจึงมีตัวแทนไอโซเลทจากจังหวัดขอนแก่นในการทดลองครั้งนี้ถึง 11 ไอโซเลท จาก 8 อำเภอ ปัจจัยในการระบาดและความรุนแรงของโรคแส้ดำเกี่ยวข้องกับพันธุ์และสภาพแวดล้อมของการเกิดโรค จากรายงานของ Ferreira and Comstock (1989) พบว่าอ้อยพันธุ์ต้านทานจะเกิดโรคได้น้อยกว่าพันธุ์อ่อนแอ และจากรายงานของ Hoy *et al.* (1993) พบว่าความชื้นของดินมีผลต่อความมีชีวิตของเชื้อ ดินที่มีความชื้นสูงสปอร์จะมีชีวิตได้ 7-9 สัปดาห์ ในขณะที่ดินที่แห้งความมีชีวิตของสปอร์จะยาวนานขึ้น คือความมีชีวิตจะลดต่ำลงเมื่อเข้าสัปดาห์ที่ 23 พื้นที่ที่แห้งแล้งกว่าสปอร์ของเชื้อจึงมีชีวิตอยู่ในดินได้ยาวนานกว่าพื้นที่ที่มีปริมาณฝนตกมากกว่า ปริมาณของเชื้อ (inoculum) ที่มากกว่าเป็นตัวการที่ทำให้โอกาสการเป็นโรคมีมากกว่าด้วย นอกจากนี้ปริมาณการปลูกอ้อยต่อพื้นที่ก็มีผลเช่นเดียวกัน ซึ่งบริเวณที่มีการปลูกอ้อยแปลงใกล้กันเป็นพื้นที่กว้าง เชื้อสามารถแพร่กระจายได้โดยอาศัยแรงลม แปลงปลูกที่อยู่ใกล้กัน ต้นที่เป็นโรคสามารถแพร่กระจายสปอร์ให้ต้นปกติเป็นโรคได้ในระยะ 11.1-16.5 เมตร (Hoy and Grisham, 1988) ทั้งนี้ในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ไม่สามารถระบุพันธุ์อ้อยได้ ทำให้ไม่สามารถเลือกเก็บจากแปลงที่

ปลูกพันธุ์อ่อนแอ จึงไม่ได้เชื้อจากบางอำเภอ ประกอบกับช่วงระยะที่เก็บตัวอย่างเป็นช่วงเดือนมกราคม ซึ่งอ้อยมีอายุมากและเป็นอ้อยปลูกมากกว่าอ้อยตอ การพบเห็นโรคจึงเป็นไปได้ยากกว่าช่วงที่อ้อยเจริญในระยะอ้อยตอ (Akalach and Touil, 1996)

การศึกษาการจัดกลุ่มเชื้อรา *U. scitaminea* ที่ได้จากพื้นที่ปลูกอ้อยในแหล่งต่าง ๆในประเทศไทยทั้งสิ้น 43 ไอโซเลท โดยแบ่งการทดลองเป็นการศึกษาทางสรีรวิทยาของเชื้อและการจัดกลุ่มด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อโดยการศึกษาความแตกต่างของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ teliospore แต่ละแหล่ง พบว่า สปอร์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5-10 ไมโครเมตร ค่าเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 7.5 ไมโครเมตร สอดคล้องกับสุวนิตย์ (2524) และศิริลักษณ์ (2547) ซึ่งรายงานว่าสปอร์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 7.5 และ 6.50-7.60 ไมโครเมตร ตามลำดับ โดยลักษณะภายนอกของสปอร์จะมีสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ผิวขรุขระ มีหนามแหลมที่ผิวด้านนอกสปอร์โดยรอบ ซึ่งลักษณะสัณฐานของเชื้อจะไม่แตกต่างกันกับที่รายงานโดย Singh *et al.* (2005) เมื่อนำเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ teliospore มาจัดกลุ่ม โดยวิธีทางสถิติสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ส่วนลักษณะการเจริญและขนาดของ sporidia ที่งอกจาก teliospore จะมีความหลากหลายลักษณะ มีความแตกต่างกันอย่างมากทั้งทางด้านความกว้างและความยาว จึงไม่สามารถวัดขนาดของ sporidia เพื่อนำมาจัดกลุ่มได้ การศึกษาลักษณะการเจริญและขนาดโคโลนีหลังจากนำ teliospore จากแหล่งต่าง ๆ มาทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และย้ายโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญบนอาหาร PDA พบว่าหลังจากสปอร์ของเชื้องอกเป็นเวลา 3 วัน โคโลนีของเชื้อจะมีสีขาว กลม ฟู เมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้นเริ่มเข้า 1 สัปดาห์ สีของโคโลนีจะเปลี่ยนมีสีเข้มขึ้นเป็นสีครีมถึงสีน้ำตาลอ่อน กลางโคโลนีมีสีครีมนูน เส้นใยจะยุบตัวลงไม่ฟู เส้นใยสานกันแน่น ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเฉลี่ยเมื่อเชื้อมีอายุ 28 วัน มีขนาด 6.27 เซนติเมตร สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม และเมื่อจัดกลุ่มตามลักษณะของโคโลนี สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม การนำลักษณะและขนาดของโคโลนีมาใช้ในการจัดกลุ่มนั้นมีความแปรปรวนได้มากเนื่องจาก ลักษณะการเจริญและขนาดของโคโลนีของเชื้อเกี่ยวเนื่องกับการงอก teliospore ซึ่งขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสารอาหาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อที่เจริญบนอาหารที่มีสารอาหารสูง teliospore จะงอกเป็น sporidia มาก ในขณะที่อุณหภูมิที่ต่ำลงและเชื้อเจริญบนอาหารที่มีสารอาหารต่ำ teliospore จะงอกเป็นเส้นใยมาก (Bock, 1964) ดังนั้นลักษณะที่แตกต่างของโคโลนีนอกจากจะขึ้นกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อแล้วยังเกี่ยวเนื่องกับสภาพแวดล้อมในการเจริญของเชื้อด้วยเช่นกัน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อในครั้งนี้เพื่อใช้เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาในอนาคต

การศึกษาการจัดกลุ่มเชื้อรา *U. scitaminea* ด้วยเทคนิค RAPD ใช้ไพรเมอร์ 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ VNTR และ ITS พบว่า ไพรเมอร์ VNTR ให้ลักษณะรูปแบบของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท ส่วนไพรเมอร์ ITS พบว่าเชื้อ 43 ไอโซเลท มีจำนวนแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน เมื่อนำมาจัดกลุ่มพบว่า ไม่สามารถจัดกลุ่มตามแหล่งที่มาของเชื้อได้ ซึ่งในประเทศไทย ศิริลักษณ์ (2547) ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ A-07, A-09, G-08 และ G-10 ตรวจสอบเชื้อ 70 ไอโซเลท จาก 7 แหล่งปลูกอ้อย พบว่าเชื้อ *U. scitaminea* จากจังหวัดชัยภูมิ, นครราชสีมา, บุรีรัมย์, กาฬสินธุ์ และอุดรธานี สามารถจัดกลุ่มตามแหล่งที่มาของเชื้อได้อย่างชัดเจน ส่วนเชื้อที่มาจากจังหวัดขอนแก่นและชลบุรี ไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *U. scitaminea* ในต่างประเทศ เช่นการศึกษาในประเทศจีน สามารถแบ่งเชื้อ 18 ไอโซเลท จากแหล่งปลูกเชื้อทั่วประเทศจีน 6 แหล่งได้ 6 กลุ่ม โดยใช้เทคนิค RAPD (Xu *et al.,* 2004) อย่างไรก็ตามหลายครั้งที่มีการจำแนกเชื้อด้วยเทคนิคทางโมเลกุลกลับไม่พบความแตกต่างของเชื้อในแต่ละไอโซเลท เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ Singh *et al.* (2005) นำเทคนิค RAPD มาจัดจำแนกความแตกต่างของเชื้อ *U. scitaminea* ที่เก็บรวบรวมได้จาก South Africa, เกาะ Reunion, Hawaii และ Guadlope โดยใช้ดีเอ็นเอทั้งจากส่วนของ sporidia และเส้นใย ด้วยไพรเมอร์ UBC 220, UBC 222, UBC 230, T7 และ K5 ผลการทดลองไม่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของเชื้อที่ได้จากไอโซเลทเหล่านี้ การศึกษาความแตกต่างของเชื้อ 38 ไอโซเลท จาก 13 ประเทศของ Braithwaite *et al.* (2004) พบความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับต่ำ ดังนั้นการผันแปรทางพันธุกรรม ความรุนแรงของเชื้อ การเกิดเชื้อสายพันธุ์ใหม่อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อย การศึกษาของ Schenck *et al.* (2005) ตรวจสอบเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เข้าทำลายอ้อยพันธุ์ H78-7705 ในฮาวาย แยกความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์เก่าและสายพันธุ์ใหม่ด้วยเทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์ 310 ไพรเมอร์ และเมื่อทำการจัดกลุ่มพบว่า การจัดกลุ่มที่ได้ไม่แสดงแยกชัดถึงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เก่าและสายพันธุ์ใหม่ที่พบ ซึ่งอาจแสดงได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่พบอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อในแบบ single mutation

จากการศึกษาลักษณะของเชื้อรา *U. scitaminea* จำนวน 43 ไอโซเลท จาก 36 อำเภอ และ 19 จังหวัด ในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทยในช่วงปี 2548-2549 พบว่า เชื้อที่อยู่ในพื้นที่ที่ทำการศึกษา มีการกระจายตัวทั่วไป ไม่พบความเฉพาะเจาะจงในแต่ละพื้นที่ แสดงให้เห็นว่า การเกิดโรคและความรุนแรงของโรคแส้ดำอ้อยในประเทศไทย น่าจะเกี่ยวเนื่องกับระดับความต้านทานของพันธุ์อ้อยและสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของเชื้อสาเหตุโรค

การศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ก่อนการแสดงอาการของโรคด้วยเทคนิคการย้อมสีเชื้อที่เจริญอยู่ในต้นกล้าอ้อยด้วยสีย้อม trypan blue และเทคนิค PCR โดยใช้อ้อยทดสอบจำนวน 4 พันธุ์ คือ K84-200, อู่ทอง 1, H59-3775 และกำแพงแสน 94-13 ตรวจสอบอ้อยด้วยวิธีดังกล่าวหลังทำการปลูกเชื้อด้วยการฉีด sporidia suspension ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เข้าต้นกล้าอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจสอบตามอายุ คือ หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 1 วัน, 3 วัน, 5 วัน, 1 สัปดาห์, 2 สัปดาห์, 3 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยแบ่งตำแหน่งที่ทำการตรวจเชื้อเป็น 3 ตำแหน่งคือ บริเวณบนและล่างตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อและตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 2) จากการทดลองครั้งนี้พบว่าวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย trypan blue สามารถตรวจสอบพบเชื้อตั้งแต่วันแรกและพบเชื้อในต้นกล้าอ้อยทุกพันธุ์ที่ทำการทดสอบ ในขณะที่วิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ *b*E4 และ *b*E8 ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อในอ้อยหลังทำการปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ให้ขนาดแถบดีเอ็นเอ 450 bp ตรวจพบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในอ้อยทดสอบพันธุ์ 94-13 จำนวน 3 ต้นในทุกตำแหน่งที่ทำการทดสอบ และตรวจพบในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 จำนวน 1 ต้น บริเวณเหนือตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อและบริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ ซึ่งผลการทดลองนี้แตกต่างจากการทดลองของ Singh *et al.* (2004) ศึกษาการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR และ การตรวจเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่ย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue โดยทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ความเข้มข้น 10^1 - 5×10^5 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ในอ้อยทดสอบ 3 พันธุ์คือ N19 (พันธุ์ต้านทาน), N12 (พันธุ์ต้านทานปานกลาง) และ NCo 310 (พันธุ์อ่อนแอ) พบว่าวิธีการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR ให้ผลดีกว่าการตรวจสอบเชื้อด้วยการย้อมสี Lactophenol cotton blue ผลการทดสอบที่แตกต่างกันอาจเกิดจากการชนิดของสีย้อม สีย้อม trypan blue เป็นสีย้อมที่มีการนำมาใช้สำหรับตรวจเชื้อ *U. scitaminea* โดยเฉพาะ การย้อมด้วยสี trypan blue จึงมีความเจาะจงและตรวจสอบเชื้อได้ดีกว่าการใช้สีย้อม Lactophenol cotton blue ดังเช่นการศึกษาของ Sinha *et al.* (1982) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อที่เจริญภายในตาอ้อยด้วยสี trypan blue พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อได้หลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษาของ อัปสร และคณะ (2537) ที่พบว่าการย้อมสีเชื้อภายในเนื้อเยื่อเจริญด้วยสีย้อม trypan blue และการตรวจการสร้างแส้ในแปลง ให้ผลใกล้เคียงกัน จากอ้อยทดสอบ 100 clone พบการสร้างแส้ 63 clone ตรวจพบแส้ก่อนการสร้างแส้ 53 clone แสดงให้เห็นว่าวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่อ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอ้อยได้อย่างรวดเร็วก่อนการแสดงอาการของอ้อยที่ใช้เวลานานกว่ามาก สำหรับวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ให้ผลแตกต่างจาก Singh *et al.* (2004) อาจเนื่องจากปริมาณของเชื้อที่เจริญอยู่ในต้นกล้าอ้อยช่วง

ที่ทำการตรวจสอบมีปริมาณน้อยไม่เพียงพอให้เกิดปฏิกิริยาขึ้น เนื่องจากผลของการปลูกเชื้อในชุดเดียวกันพบว่า หลังจากปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน พบการเกิดโรค 16%, 10%, 3% และ 0% ในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1, กำแพงแสน 94-13, H59-3775 และ K84-200 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ สามารถตรวจพบได้ในทุกพันธุ์ และทุกระยะที่ทำการตรวจสอบ แต่ไม่สามารถบอกได้ถึงความแตกต่างของสายพันธุ์อ้อยที่นำมาทดสอบได้

สรุป

วิธีการปลูกเชื้อที่มีประสิทธิภาพทำให้ต้นอ้อยแสดงอาการของโรคได้รวดเร็วที่สุด คือ การปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด teliospore suspension ความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เข้าสู่ต้นกล้าอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ โดยทำให้เกิดโรคในอ้อยพันธุ์ อู่ทอง 1 และ H59-3775 หลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 2 เดือน เมื่ออ้อยมีอายุครบ 4 เดือน พบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 30% และ 35 % ตามลำดับ อย่างไรก็ตามด้วยวิธีนี้ตรวจไม่พบการเกิดโรคในอ้อยพันธุ์ K84-200 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทาน และพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ

วิธีการตรวจสอบเชื้อ *U. scitaminea* ภายในต้นกล้าอ้อยหลังทำการปลูกเชื้อ ก่อนการแสดงอาการของโรคโดยวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสีย้อม trypan blue และเทคนิค PCR พบว่าการตรวจเชื้อด้วยสีย้อม trypan blue สามารถตรวจพบเชื้อ 1 วันหลังทำการปลูกเชื้อและตรวจพบเชื้อในทุกระยะเวลาและทุกพันธุ์ที่ทำการทดสอบ ในขณะที่การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และตรวจพบเฉพาะในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และพันธุ์อู่ทอง 1 ได้ขนาดแถบดีเอ็นเอ 450 bp ตรวจไม่พบในอ้อยพันธุ์ K84-200 และ H59-3775

เชื้อรา *U. scitaminea* จากแหล่งปลูกอ้อย ภาคกลาง, ภาคตะวันออก, ภาคตะวันตก, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ รวมทั้งสิ้น 43 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore ขนาดและลักษณะโคโลนีของเชื้อ และศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ VNTR และ ITS พบว่า การจัดกลุ่มตามลักษณะที่ศึกษา ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งของเชื้อ